

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER WACHSTUMSFÖRDERNDE STOFFE UND
DIE ÜBERLEBENSZEIT VON BACTEROIDES THETA-
JOTAOMICRON UND SPHAEROPHORUS VARIUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Holger Burgard
Tierarzt aus Helgoland

Berlin 1972
Journal-Nr. 764

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

STUDIEN ÜBER WACHSTUMSFÖRDERNDE STOFFE UND
DIE ÜBERLEBENSZEIT VON BACTEROIDES THETA-
JOTAOMICRON UND SPHAEROPHORUS VARIUS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Holger Burgard
Tierarzt aus Helgoland

Berlin 1972
Journal-Nr. 764

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender:	Prof. Dr. J. Boch
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. J. Fechner



Tag der Promotion: 14. 2. 1972

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	4
Schrifttum	6
Eigene Untersuchungen	23
I. Material und Methodik	23
1. Material	23
2. Methodik	25
II. Ergebnisse	27
1. Einfluß des Nährmediums auf das Wachstum	27
a. Morphologische Eigenschaften	27
b. Anfärbung	28
c. Wachstumseigenschaften	28
d. Wachstumsintensität	32
2. Wachstumsförderung durch Zusätze zum Nährmedium	34
a. Wachstumseinfluß des X- und V-Faktors (Plättchentest)	34
b. Ammenwachstum	35
c. Wachstumseinfluß durch Rindergalle	37
d. Wachstumseinfluß durch Fildes-Extrakt	37
3. Überlebenszeit bei Aufbewahrung der Stämme bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Nährmedien	39
Besprechung	56
Zusammenfassung	62
Literaturverzeichnis	63



Digitized by the Internet Archive
in 2026

E i n l e i t u n g

Nach W e r n e r (1968) sind die Keimarten der gramnegativen anaeroben sporenlosen Stäbchen nicht sehr eingehend untersucht worden, weil technische Mängel ihren Nachweis erschweren. Es entstand daher die Meinung, daß diese Keime von untergeordneter Bedeutung seien.

Neuere Untersuchungen haben aber ergeben, daß man die Vertreter der Familie der Bacteroidaceae als zahlenmäßig häufigen Anteil in der menschlichen und tierischen Flora des Intestinaltraktes findet, und daß diese Keime auch in Eiterungsprozessen bei Mensch und Tier oft nachgewiesen werden können.

Eine strikte Anaerobiose und optimale Nährmedien sind für die Anzüchtung ein dringendes Erfordernis. Es genügt nicht, die üblichen bakteriologischen Untersuchungsmethoden anzuwenden. Auch die Erhaltung einer einmal gewonnenen Kultur kann Schwierigkeiten bereiten.

Das Bestreben, die für die Isolierung der gramnegativen anaeroben sporenlosen Stäbchen benutzten Nährmedien durch Zusatz wachstumsfördernder Stoffe zu verbessern, ist verständlich und findet seinen Ausdruck darin, daß nicht nur serum- und bluthaltige Nährmedien, sondern auch Zusätze von Glukose, Hefeextrakt und Zystein (B e e r e n s, 1962) empfohlen worden sind. Die Förderung des Wachstums durch Zugabe von 20 % Rindergalle hat weiterhin für die Untersuchung bestimmter Keimarten eine Rolle gespielt. Auch ist in der Literatur (H a u p t, 1964) die Mitteilung zu finden, daß der X- oder V-Faktor das Wachstum dieser Keime begünstigen würde.

Mir wurde die Aufgabe gestellt zu prüfen, ob einerseits der X- oder V-Faktor auf das Wachstum von Sphaerophorus varius und Bacteroides thetajoamicron einen Einfluß hat, andererseits ob einzelne Keime anderer Spezies wie Staphylokokken, E. coli und

Pseudomonas aeruginosa als Ammen mit Vorteil benutzt werden können. Auch den Einfluß eines Zusatzes des Fildes-Extraktes sowie von Rindergalle zum Nährboden auf das Wachstum sollte ich feststellen.

Schließlich war noch vorgesehen, bei den Untersuchungen gleichzeitig zu prüfen, wie lange Zeit die anaeroben Keimarten unter aeroben Bedingungen in verschiedenen Nährmedien und unter Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen (+ 5, + 22, + 37°C) lebend erhalten werden können.

S c h r i f t t u m

Morphologie

Alle Autoren sind sich darüber einig, daß es sich bei *Bacteroides thetaiotaomicron* und *Sphaerophorus varius* um strikt anaerob wachsende gramnegative und unbewegliche Keime handelt. Sie bilden weder Sporen noch Kapseln. In frischem Material findet man bis zu 100 μ lange und 0,5 - 1,0 μ breite fädige Elemente. Kurze Stäbchen, die etwa 0,5 μ breit und 1,5 μ lang sind, sieht man weniger häufig und dann vorwiegend in älteren Kulturen. Die optimale Wachstumstemperatur liegt zwischen 35 - 40°C. Der optimale pH-Wert der Nährmedien wird mit 7,4 - 7,6 angegeben.

K o l l e und H e t s c h (1952) beschreiben Verzweigungen und Verdickungen an den Fadenenden von *Sphaerophorus necrophorus*. Sie bezeichnen sie als Involutionsformen. Das Protoplasma ist oft stark gekörnelt. Häufig gliedern sich die Fäden in kokkoidähnliche oder kurze zylindrische Bildungen. *Bacteroides funduliformis* wird als 2 - 3 μ langes, etwas gekrümmtes Stäbchen beschrieben, das Polymorphismus zeigt.

A a l b a e k (1971) fand bei 23 *Sphaerophorus necrophorus*-Stämmen homogene und granulierte Zellen. Anschwellungen waren selten. Bei B e v e r i d g e (1934) kamen in älteren Kulturen kokkoide Formen, in jungen dagegen Stäbchen und Fäden vor. Bei einem Stamm fand er unabhängig von dem Alter der Kultur fast keine Fäden.

B u h l e r, S e e l y und D i x o n (1942) sahen bei den von ihnen untersuchten Keimen bipolare Stäbchen und Pleomorphismus. C é s a r i und A l l e a u x (1912) fanden in ihrem Untersuchungsmaterial lange Fäden, die nach mehreren Passagen durch Martin-Bouillon immer kürzer wurden.

D a c k, D r a g s t e d t und H e i n z (1936) isolierten pleomorphe Stäbchen; außerdem wurden einige fädige Elemente beobachtet. Echte Verzweigungen wurden nicht gesehen. D a c k, D r a g s t e d t, J o h n s o n und M c C u l l o u g h (1938) entdeckten, daß die aus Rinderleberabszessen isolierten Stämme mehr fädige Elemente enthielten als die, welche aus dem Colon isoliert wurden. Bei allen Stämmen wurde Pleomorphismus festgestellt, der sich durch den Zusatz von 1 mg/ml Vitamin C zum Nährboden verstärken ließ.

E r n s t (1902) isolierte homogen gefärbte Fäden, die quadratisch gegliedert waren. In Agargelatine kamen nur kurze, dünne Stäbchen vor, die in Martin-Bouillon oft zu mehreren 100^{er} langen Fädchen auswuchsen. In alten Kulturen, besonders in Nährsubstraten festerer Konsistenz, gaben sie bald wieder den Stäbchen Platz. Außerdem konnten besonders in älteren Kulturen Verzweigungen gesehen werden.

F r a n k e (1899) beschreibt ein schlankes, an den Enden leicht abgerundetes Stäbchen von wechselnder Länge und der Neigung, zu Fäden auszuwachsen. G r u m b a c h (1958) charakterisiert *Sphaerophorus funduliformis* als ein durch spitze Enden gekennzeichnetes Stäbchen und einem typischen Polymorphismus im direkten Ausstrich des Eiters. Neben kurzen feinen Stäbchen kommen plumpere, ausgesprochen bipolar gefärbte ("wurstförmige") und lange, z.T. Verdickungen und Verzweigungen aufweisende Fäden vor.

H a r d e r s und H o r n b o s t e l (1950/51) konnten schlanke Stäbchen von sehr unterschiedlicher Länge, zuweilen spindelförmigen Verdickungen und Fadenbildung in von menschlichen Nekroseprozessen entnommenem Material nachweisen. H a r t w i g k und T z i m a s (1966) verglichen Tier- und Menschenstämme. Während bei den Menschenstämmen kurze Formen überwogen, kamen in dem tierischen Material vermehrt Stäbchen vor, die sich in älteren Kulturen noch verlängerten.

H a u p t (1964) beschreibt die Bacteroides-Arten als Stäbchen mit runden Enden. Kapseln und Geißeln sind selten, sie kommen aber vor. *Necrobacterium necrophorum* sind Stäbchen wechselnder Länge und Dicke. Bisweilen können Fäden vorkommen. Auch spindelförmige Auftreibungen werden beobachtet.

I p p e n und S t o l l (1960) sahen in von Saiga-Antilopen isolierten Stämmen längliche, schlanke Stäbchen und Fäden. Im Protoplasma bildeten sich kleine Körnchen.

J a n s e n, F l i n t und G r i n e r (1954) erzeugten beim Lind experimentell Nekrobazillose. Das Material wurde aus Leberabszessen gewonnen. Die Länge der Filamente nahm mit dem Alter der Abszesse ab. In frischen Abszessen fanden sich abgerundete und filamentöse, in alten dagegen gerade kurze Stäbchen. L a h e l l e (1947) entnahm Material vom Rand und von der Mitte nekrotischer Prozesse. Zur Peripherie hin wurden die Fäden länger. Auf Blutagar-Kulturen schienen Anschwellungen an den Elementen typisch zu sein. Auch I s f f l e r (1884) sah das Auftreten spindeligter Anschwellungen an den Elementen. Er deutete sie als Involutionerscheinung.

P r é v o t (1966) stellte bei allen Sphaerophorus-Arten starke Pleomorphie fest. Anschwellungen, freie und an den Enden festsetzende Sphäroblasten sowie Verzweigungen der Fäden kamen vor. Sphaerophorus varius bildete fast nur Stäbchen. R o s e n (1970) beschreibt lange, granulierte Filamente mit ausgeprägter Pleomorphie. Es kommen auch kurze Stäbchen oder sogar kokkoid Elemente vor. S c h m o r l (1891) sah in jüngeren Kulturen fast nur lange Fäden, in älteren Kulturen jedoch häufiger kurze kokkoidenähnliche Gebilde. Rechte Verzweigungen kamen nicht vor. S c r i v n e r und L e e (1934) bestätigten die Pleomorphie. Auch sie fanden in jungen Kulturen längere Fäden, aber auch bipolare kurze Stäbchen, die sogar kokkoid erscheinen konnten.

S h a w (1933) konnte bei allen von ihm untersuchten Stämmen kokkoide bis fadenförmige Keime beobachten, die an den Enden Schwellungen aufwiesen. Zu gleichen Ergebnissen kamen S i m o n und S t o v e l l (1969). Sie sprechen von grosser Pleomorphie.

W e r n e r und M ü l l e r (1971) unterteilten die Gattung Sphaerophorus in zwei Spezies. Bei Sphaerophorus necrophorus findet man gleichzeitig lange Stäbchen (3 - 10 μ) und sehr kleine in Haufen beieinander liegende kokkoide Zellen von kaum 0,5 μ Durchmesser. Sphaerophorus varius bildet schlanke Kurzstäbchen. In flüssigen Medien erscheinen kokkoide bis elliptische Zellen, die eine Neigung zur Kettenbildung erkennen lassen.

W i l l i s (1960) beschreibt Fusiformis necrophorus als pleomorph. Lange und kurze Stäbchen mit abgerundeten Enden sind vorwiegend vorhanden. Auch wurden kokkoide Formen und - besonders auf festen Nährmedien - lange Filamente gefunden.

Nach B r e e d, M u r r a y und S m i t h (1957) werden Bacteroides und Necrobacterium definiert. Gemeinsam sind ihnen ihre Unbeweglichkeit und Sporen- und Kapsellosigkeit. Sie bilden Stäbchen wechselnder Länge und wachsen nur anaerob. Typisch für das Necrobacterium ist seine Pleomorphie. Es weist unregelmäßige Dicken und Längen auf und neigt zur Fadenbildung. Die Zellen der Gattung Bacteroides sind dagegen Stäbchen mit abgerundeten Enden.

Anfärbung

Einig sind sich alle Autoren darüber, daß es sich sowohl bei Bacteroides- als auch bei Sphaerophorus-Spezies um gramnegative Keime handelt. Auch die Metachromasie, die sich bei älteren Kulturen verstärkt, wird immer wieder beschrieben. H a r t w i g k und T z i m a s (1966) fanden gleichmäßig gefärbte Elemente. Nach H a u p t (1964) ist das *Necrobacterium necrophorum* nicht gramfest. Mit Löfflers Methylenblau oder Karbolfuchsin erhält man eine unterbrochene Färbung (ähnlich Eisenbahnschienen mit Schwellen). F r a n k e (1899) färbte mit Löfflerscher Lösung oder Karbolmethylenblau. Er stellte fest, daß der "Necrose-Bacillus" nicht gramfest ist. Die Elemente färbten sich ungleichmäßig. Blasse Lücken blieben bestehen. Auch L a h e l l e (1947) hielt die Gramfärbung nicht für ideal, weil sie die Zellen nicht immer gut färbte. Nach S h a w (1933) werden die Keime bei der Gramfärbung entfärbt.

Bei A a l b a e k (1971) färbten sich die verwendeten *Sphaerophorus necrophorus*-Stämme homogen. Auch granulierten Zellen kamen vor. E r n s t (1902) sah eine leiterähnliche Anfärbung durch Gentianaviolett, Fuchsin und Thionin. Nach H a l l m a n n (1961) ist eine eisenbahnschienenähnliche Farbausparung charakteristisch für das *Necrobacterium necrophorum*. Es wird der Eindruck einer Sporenbildung hervorgerufen. Bei I p p e n und S t o l l (1960) zeigten sich Farbausparungen, die bei Fuchsinfärbung deutlicher wurden. L o e f f l e r (1884) fiel das merkwürdig gefleckte Aussehen der Keime auf. Helle Stellen wechselten mit dunkleren ab. R e w o und S h u k o w a (1963) geben ein Fuchsin-Blau-Farbstoffgemisch nach Muromzew an. Mit Anilinfarbstoffen wird nur eine langsame und unregelmäßige Färbung der Elemente erreicht.

O r c u t t (1930) fand im Gegensatz zu allen anderen Untersuchern Metachromasie nur bei jungen Kulturen. Bei B e v e r i d g e (1934) dagegen waren nur die Elemente, die jünger als 20 Stunden waren, gleichmäßig gefärbt. Später trat starke Metachromasie auf. Nach B u h l e r, S e e l y und D i x o n (1942) färbt sich das *Bacterium necrophorum*, nicht aber das *Bacterium funduliformis bipolar*.

Optimale Nährmedien

Die Anzüchtung der gramnegativen anaeroben sporenlosen Stäbchen hat seit dem Beginn ihrer Erforschung immer wieder Schwierigkeiten bereitet. Die Keime stellen hohe Anforderungen an das Nährmedium. Außerdem wachsen sie nur dann, wenn absolute Anaerobiose hergestellt werden kann. Gerade diese technische Schwierigkeit hat es älteren Autoren oft unmöglich gemacht, umfangreichere Untersuchungen durchzuführen.

S c h m o r l (1891) sah Wachstum nur in erstarrtem Hammelblutserum. Auf der Oberfläche wurde ein Wachstum nicht beobachtet. Das flüssige Serum gerann durch das Wachstum allmählich. In Gelatine- oder Agar-Platten konnte er die Keime auch dann nicht anzüchten, wenn Zucker oder ameisensaures Natron hinzugefügt wurde. Andererseits erkannte er ein Ammenwachstum: auf den angegebenen Nährböden konnte er die Keime durch Metabiose eines nicht pathogenen Kokkus herbeiführen. B a n g (1891/92) und S c h o o p (1939) benutzten Gelatine-Agar, dem Serum hinzugefügt war, mit gutem Erfolg. Auf gewöhnlichem Gelatine-Agar zeigte sich das Wachstum weniger üppig. Ein Zusatz von Zucker störte es. Auch E r n s t (1902) sah eine Wachstumshemmung bei zuckerhaltigen Nährmedien.

B e v e r i d g e (1934) konnte die von ihm verwendeten Stämme auf fast allen gewöhnlichen Nährmedien unter anaeroben Bedingungen anzüchten. Für seine Untersuchungen benutzte er einen Nährboden aus gekochtem Fleisch und den "V.F.-Agar",

der sich durch einen Zusatz von Serum noch verbessern ließ. Als optimal sah er den Koch-Herz-Nährboden (nach Lepper u. Martin, 1929) und das Gehirn-Medium (nach Hibler, 1899) an. Auf gewöhnlichem Pepton-Agar und Glycerin-Pepton-Agar stellte er Wachstum erst nach längerer Inkubation fest. Mit goldgelben Staphylokokken und *E. coli* gingen die Kulturen eine Symbiose ein. Für ihr Wachstum waren dann keine anaeroben Bedingungen mehr erforderlich. Auch nach B u h l e r, S e e l y und D i x o n (1942) kann in Gegenwart anderer Keime das *Bacterium necrophorum* aerob auf Blut-Agar wachsen. Gute Wachstumsbedingungen boten sich in Rosenow-Medium.

C é s a r i und A l l e a u x (1912) benutzten Martin-Bouillon mit und ohne den Zusatz von 0,2 % Glukose, der das Medium verbesserte. Mit gutem Erfolg fügten D a c k, D r a g - s t e d t und H e i n z (1936) dem Agar 10 % Schafblut zu. Schnelles Wachstum wurde im Rosenow-Medium erreicht. Der Zusatz von 0,05 % Zystein förderte das Wachstum ebenso wie 20 % Schafserum. 0,1 % Zystein hat nach D a c k, D r a g - s t e d t, J o h n s o n und M c C u l l o u g h (1938) den gleichen Effekt.

F l o y d und D a c k (1939) isolierten die Keime auf Blut-Agar, dem 5,5 - 6,0 % 95 %iger Alkohol zugesetzt war, um das Schwärmen von *Proteus* zu verhindern. Die kulturellen Charakteristika wurden hierdurch nicht verändert.

G i b b o n s und M a c D o n a l d (1960) benutzten den Herz-Infusion-Agar Difco mit 10 % defibriniertem Pferdeblut. Zur Herstellung eines "Wachstumsfaktors" auf Blut-Agar impfte er *Staph. aureus*-Stämme auf die Platte. 7 von 14 seiner *Bacteroides melaninogenicus*-Stämme wurden im Wachstum ammenartig gefördert, die übrigen waren davon unabhängig. 12 von 14 Stämmen wurden auf Trypticase-Soy-Blutagar (BBL) mit 0,05 % Thio-glykolat durch Hämin gefördert. Alle Stämme benötigten Hämin. Vitamin-K und Naphthalen-Derivate mit Sauerstoff-, Hydroxyl- oder Carboxyl-Gruppen in α -Stellung ersetzten den Wachstumsfaktor bei der Ernährung der Organismen.

H a r t w i g k und T z i m a s (1966) hatten auf der Traubenzuckerblut-Agar-Platte (nach Zeissler) bei einem Zusatz von 10 % defibriniertem Hammelblut den besten Wachstumserfolg. Das Fehlen von Traubenzucker wirkte sich nachteilig aus. Für die Erhaltung von Reinkulturen war Thioglykolat besonders günstig. Pferdeserum förderte das Wachstum in gewöhnlicher Nährbouillon. Auch Leber-Leber-Bouillon, die nicht besser war als gewöhnliche Nährbouillon, Pope- und Martin-Bouillon, wurden durch Pferdeserum verbessert. Auch der X- und V-Faktor, der das Wachstum von *Bacteroides melaninogenicus* fördert (S c h w a b a c h e r, L u k a s und K i m i n g t o n, 1947), schien das Wachstum der Keime zu begünstigen. Ein α - β -hämolytischer *Staphylococcus pyogenes aureus* gab das Phänomen des Ammenwachstums zu erkennen. Allerdings waren die Ergebnisse nicht immer reproduzierbar. Das Hämolysin des *Staphylococcus* hemmte das Wachstum von *Sphaerophorus necrophorus*.

Nach H a u p t (1964) wachsen *Bacteroides*-Arten auf gewöhnlichen Nährböden nur in Gegenwart von tierischem Eiweiß. Für das *Necrobacterium necrophorum* empfiehlt er einen halbfesten Nähragar mit einem Serumzusatz und Bouillon. Zur einfachen Feststellung des Bedarfes einer Kultur an X- bzw. V-Faktor wird die Methode nach Zinnemann (1960) angegeben. Beimpft wird eine Kochblut-Agar-Platte, die den X-Faktor enthält, während der hitzelabile V-Faktor im Autoklaven zerstört wurde, und ein Proteose-Agar Nr. 3 Difco (ohne X- und V-Faktor). Der V-Faktor kann durch *Micrococcus pyogenes aureus*, der im Bedarfsfall als Amme erscheint, gebildet werden. Der X-Faktor kann durch das von Fildes (1920) angegebene Verfahren hergestellt und dem Nährboden zugesetzt werden. 50 ml defibriniertes Blut wird 2 - 24 Stunden in 150 ml physiologischer Kochsalzlösung, der 6 ml konzentrierte Salzsäure und 1 g Pepsin zugesetzt wird, bei 55°C verdaut. Das auf pH 7,4 neutralisierte Produkt wird über Chloroform gehalten und kann monatelang aufbewahrt werden.

K o l l e und H e t s c h (1952) empfehlen für Sphaerophorus Blutserum oder mit Blut oder Serum gemischte Nährböden. Auch Serumbouillon ist geeignet. Sphaerophorus pyogenes wächst ausschließlich auf serumhaltigen Nährböden. Für Bacteroides funduliformis kann Aszites-Agar mit einem Zuckerzusatz, Blutbouillon, Hiblerscher Hirnbrei u.a. mit Erfolg verwendet werden.

Nach S i m o n und S t o v e l l (1969) ermöglichen Körperflüssigkeiten die Anfangsisolation von Sphaerophorus necrophorus. Sie stimulieren das Wachstum der Stämme, die in Gemeinschaft mit einigen Keimarten wie Staphylo- und Streptokokken auch aerob wachsen können. S o l t y s (1963) bestätigt für alle Bacteroides-, Fusobacterium- und Sphaerophorus-Arten den Bedarf an Serum, Blut oder anderen Körperflüssigkeiten. Er benutzte Koch-Fleisch-Nährböden, denen Blut, Zystein oder Aszites-Flüssigkeit zugesetzt wurden.

S p l a u d i n g und R e t t g e r (1957) setzten dem Medium 10 % Kartoffelextrakt, 0,05 % Zystein-HCl und 0,1 % Glukose zu, die einzeln hinzugefügt die von ihnen untersuchten Stämme unterschiedlich stark förderten. Alle Zusätze zusammen förderten das Wachstum optimal. Nach W i l l i s (1960) werden Fusiformis necrophorus-Stämme durch Blut, Serum und reduzierende Substanzen gefördert.

W e r n e r (1965, 1968) empfiehlt für die Fusiformis-Sphaerophorus-Gruppe 7 - 10 %igen Schafblut-Agar ohne hemmende Zusätze auch für die Erstisolierung, weil diese auch die anaeroben Keime hemmen. Außerdem haben sich Rosenow-Medium und der Hefeextrakt-Zystein-Blut-Agar (nach B e e r e n s, 1962) gut bewährt. In Glukose-Zystein-Bouillon mit und ohne einen Zusatz von 10 % Serum konnte er (1964) nach 18 - 24 Stunden reichliches Wachstum von Eggerthella convexa beobachten. 10 - 20 % Rindergalle förderten es noch deutlicher (5 x). W e r n e r und B o l l (1968 b) setzten Schafblut-Agar, Thioglykolat-Bouillon und Rosenow-Medium Rindergalle zu

und erzielten bei allen untersuchten *Bacteroides*-Arten eine deutliche Wachstumsförderung. Zu gleichen Ergebnissen führten die Untersuchungen von W e r n e r, N e u - h a u s und R e i c h e r t s (1970) an *Bacteroides fragilis*-Stämmen.

Besonders in neuerer Zeit ist versucht worden, für die gram-negativen anaeroben Stäbchen selektivnährböden zu entwickeln. Durch den Zusatz diese Keime fördernder und andere Keime hemmender Stoffe sollte dies erreicht werden.

L a h e l l e (1947) versuchte zunächst optimale Nährmedien zu finden. Wachstum konnte er bereits in gewöhnlichem 1 %igen Pepton-Wasser feststellen, das sich verstärkte, wenn er die Konzentration von Pepton auf 2 % verdoppelte. Durch Hinzufügen von 0,75 - 2 % Glukose, nicht jedoch von höheren oder niedrigeren Konzentrationen, verbesserte sich das Anzüchtungsergebnis. Eine starke Förderung konnte durch 0,03 - 0,05 % Zystein und 20 - 40 % Aszitesflüssigkeit erzielt werden. Das beste Ergebnis brachte Vollblut, das in einer Konzentration von 10 - 15 % dem Nährmedium zugesetzt wurde. Plasma und Serum waren weniger gut als Vollblut, aber besser als Kartoffel-extrakt und Aszitesflüssigkeit. Auch mit Erythrozyten allein wurden gute Ergebnisse erzielt. Symbiotisches Wachstum konnte mit *E. coli*, *Staph. aureus*, *Str. hämolyticus* und *Proteus vulgaris* festgestellt werden. Bei gleichzeitiger Beimpfung mit diesen Keimarten konnte auf die Herstellung einer Anaerobiose verzichtet werden. Er vermutete, daß sich die Symbiose nicht allein auf den Sauerstoffverzehr durch die Aerobier beschränkte. Genauere Angaben sind aber nicht gemacht worden. Im übrigen gediehen die von ihm untersuchten *Mecrobacterium*-Arten in einer H_2 - Atmosphäre besser als in einer CO_2 - Atmosphäre. Zur Isolation aus Material, das mit mehreren anderen Keimarten infiziert war, konnte vorteilhaft Blut-Agar mit Zusätzen von Brilliantgrün, Gentiana- und Kristallviolett benutzt werden.

Beeren s (1957, 1962) benutzte zur selektiven Züchtung der Sphaerophorus- und Fusobacterium-Gruppe einen Brilliantgrün-Natriumazid-Agar, auf dem Ristella- (= Bacteroides-) Arten nicht wachsen. Für diese kam ein Rindergalle-Natriumazid-Agar zur Anwendung. Ristella-Arten werden durch Rindergalle im Wachstum gefördert. Dies wurde von Beeren s und Castel (1960) und Beeren s, Castel und Fievez (1962) bestätigt. Beeren s, Schaffner, Guillaume und Castel (1963) fanden die wachstumsfördernden Substanzen in der neutralen Fraktion des Azeton-Extraktes der Rindergalle. Der Nachweis der Wachstumsförderung wurde in blut- und serumfreiem Hochschichtagar erbracht. Die Einzelkolonien waren durch einen Hof ausgefällter Gallesalze umgeben. Auch Forget und Fredette (1962) empfehlen für die Erstisolierung von Anaerobiern das Natriumazid-Selektivnährmedium. Allerdings konnte das Wachstum von Streptokokken nicht unterdrückt werden. Fusobacterium polymorphum und Sphaerophorus necrophorus wuchsen in tieferen Schichten des Agars.

Aalbak (1971) benutzte VL-Agar (= milieu viande levure), der durch 0,024 g Brilliantgrün, 0,3 g Natriumazid und 30 ml Pferdeblut je Liter Nährmedium ergänzt wurde, als Selektivnährboden. Reinkulturen wurden durch Passagen über Rosenow-Medium und VL-Agar erhalten.

Zur Isolierung anaerober sporenloser Keime wurden von Dietrich, Klein und Nickel (1965) 1 %iger Traubenzucker-Hochschichtagar mit 20 - 30 % Aszitesflüssigkeit, Leber-Leber-Thioglykolat-Bouillon und halbstarrer "Leberagar" beimpft. Für schnell wachsende Keime eignete sich die Traubenzuckervollblut-Agar-Platte, für langsam wachsende Keime die "Fortner-Platte" am besten.

Mitsuka, Segal und Yamamoto (1965) hielten die bisher verwendeten Selektivnährmedien für Bacteroides-Arten noch nicht für ideal. Sie gingen bei ihren Untersuchungen

von alkalischem Blut-Agar (EG-Agar) aus, auf dem sie gutes Wachstum erzielten, und fügten 5 % Pferdeblut hinzu, das Bacteroides-Arten deutlich förderte. Durch Begasung mit 20 % CO₂ konnte ein 3 - 4 mal stärkeres Wachstum erzeugt werden. Mit Zusätzen von Neomycin, Brilliantgrün und Natriumtaurocholat zum EG-Agar konnte ein befriedigender Selektivnährboden hergestellt werden.

Hämolyse

Zur Frage, ob Bacteroides- und Sphaerophorus-Arten Blut hämolysieren können, werden von den Untersuchern unterschiedliche Angaben gemacht. Nach R e w o und S h u k o w a (1963) haben die einzelnen Stämme eine unterschiedliche Hämolyseaktivität. Auch S h a w (1933) fand bei den von ihm untersuchten Stämmen eine unterschiedlich starke Hämolyse. Nach L a h e l l e (1947) muß bei der Beurteilung, ob Blut hämolysiert wird, die Herkunft des Blutes beachtet werden. Während Schaf-, Ziegen- und Pferdeblut nicht hämolysiert wird, ist bei der Verwendung von Rinderblut mittelstarke und bei Menschen- und Kaninchenblut starke Hämolyse festzustellen, die schon nach 24 Stunden nachzuweisen ist.

A a l b a e k (1971) sah scharf abgegrenzte Hämolysezonen, die einen Durchmesser von 6 mm hatten. Bei B é v e r i d g e (1934) waren die Zonen auf Blutagar nur 0,5 mm im Durchmesser. B u h l e r, S e e l y und D i x o n (1942) konnten die Hämolyse erst einige Tage nach Beginn des Wachstums feststellen. H a r t w i g k und T z i m a s (1966) sahen bei einigen Stämmen eine leichte Aufhellung des Nährbodens. H a u p t (1964), R o l l e (1966) und O r c u t t (1930) beobachteten Hämolysezonen um die einzelnen Kolonien. W e r n e r (1969 a) fand nach längerer Bebrütung von Bacteroides-Arten nur schwache Hämolyse. Bei Eggerthella convexa sah derselbe Autor (1964) dagegen keine Hämolysezonen.

Bestritten wird die Hämolyse von H a l l m a n n (1961). Er beobachtete lediglich einen olivgrünen Hof um die Kolonien. Auch D a c k, D a g s t e d t, J o n s o n und M c C u l l o u g h (1938) konnten keine Hämolyse bei den von ihnen untersuchten Stämmen erkennen.

Extrazelluläre Desoxyribonuklease

Nach K o t h b e r g und S w a r t z (1965) und W e r n e r (1968) konnten bei nur wenigen Keimarten extrazelluläre DNasen festgestellt werden. W e r n e r (1968) untersuchte an 100 Eggerthella- und 7 Sphaerophorus-Kulturen, ob die Bildung von DNase für die Fusiformis-Sphaerophorus- oder für die Ristella-Eggerthella- (= Bacteroides-) Gruppe spezifisch ist. Er benutzte den Sacto-DNase-Test Agar Difco, der 0,2 % DNS im Medium enthält. Bei allen Eggerthella-Arten konnte er das Enzym nachweisen. Bei den Sphaerophorus-Arten blieb der Test negativ. Wenn sich dieses Ergebnis in weiteren Versuchen bestätigen sollte, hoffte er ein differentialdiagnostisch verwertbares Merkmal gefunden zu haben. Diese Hoffnung mußte er jedoch später wieder aufgeben (W e r n e r und M ü l l e r, 1971).

Bei Bacteroides convexus fand W e r n e r (1969 b) unterschiedlich starke DNase-Bildung. Auch bei Bacteroides putredinus konnte er (1970) DNase-Aktivität nachweisen. W e r n e r und R i n t e l e n (1968) beobachteten eine DNase-Aktivität auch bei intestinalen Bacteroides-Arten.

W e r n e r und M ü l l e r (1971) untersuchten Stämme der Gattungen Fusobacterium, Leptotrichia, Bacteroides und Sphaerophorus biochemisch. Während sie bei Fusobacterium und Leptotrichia keinerlei extrazelluläre DNase fanden, wiesen sie diese bei allen Bacteroides-Stämmen nach. 2 davon waren Bacteroides thetaiotaomicron. Bei der Gattung Sphaerophorus konnten sie zwischen Sphaerophorus necrophorus, bei dem kräftige DNase-Aktivität beobachtet wurde, und Sphaerophorus varius, bei dem diese fehlte, unterscheiden.

Überlebenszeit

Die Überlebenszeit der gramnegativen anaeroben sporenlösen Stäbchen wurde bisher nur von wenigen Autoren eingehend untersucht. Fast alle betonen die große Empfindlichkeit gegenüber freiem Sauerstoff.

T u n n i c l i f f (1938) bemerkte ein schnelles Absterben der von ihm benutzten Keime durch Austrocknung. Auf feucht gehaltenen Weiden konnte er 30 Tage lang infektiöses Material finden. Auf trockenen Böden verkürzte sich diese Zeit um die Hälfte. Bei Schafen konnte nach viermonatigem Frostwetter kein "infektiöses Tier" mehr festgestellt werden.

D o e h n e r (1944) stellte in erkrankten Klauen 3 Jahre lang lebende Nekrosebakterien fest. In feuchten Weiden verkürzte sich die Überlebenszeit auf ca. 4 Wochen, in trockenen Böden sogar auf nur 2 Wochen. O p p e r m a n n (1946) kam zu gleichen Ergebnissen.

Nach B e h r e n s (1962) können die Keime in erkrankten Schafklauen bis zu 3 Jahren leben. In atmosphärischer Luft überleben sie jedoch nicht länger als 24 Stunden. Normale Böden sind bei Temperaturen von weniger als + 4°C noch 7 - 10 Tage, trockene Böden 2 Tage und feuchte Böden höchstens 4 Wochen infektiös. B e h r e n s, D o e h n e r, S c h e e l j e und W a s s e r m u t h (1969) fanden nach 3 1/2 Jahren in erkranktem Klauenmaterial noch lebende Keime. Auf trockenen Weiden konnten sie nach 8 Tagen, auf nassen Weiden und feuchten Böden 2 - 4 Wochen infektiöses Material nachweisen. Auch H i e p e (1970) fand in nekrotischem Klauengewebe 3 Jahre lang lebensfähige Keime, die allerdings nur 3 Monate infektiös blieben. Auf der Weide können nach 15 - 30 Tagen noch Infektionen auftreten. Nach R e w o und S h u k o w a (1963) sind die Keime unter aeroben Bedingungen 3 - 5 Tage, anaerob und eingefroren bis zu 5 Jahren virulent.

Die Überlebenszeit unter Laboratoriumsbedingungen wird meist nur sehr ungenau angegeben. A a l b a e k (1971) bewahrte Reinkulturen von *Sphaerophorus necrophorus* in Rosenow-Medium bei Zimmertemperatur auf und überimpfte sie in dreiwöchigen Intervallen. In neutralem Medium fanden C é s a r i und A l l e a u x (1912) und L a h e l l e (1947) nach 1 - 2 Monaten noch lebende Keime. C h r i s t (1956) setzte seine Kulturen dagegen schon nach 4 - 6 Tagen um. Nach K o l l e und H e t s c h (1952) sind die Keime in Tarozzi-Bouillon gegen äußere Schädigungen ziemlich widerstandsfähig.

R e i n h o l d (1971), der seine *Bacteroides thetaiotaomicron*- und *Bacteroides fragilis*-Kulturen auf Fortner-Blutplatten aufbewahrt, setzt diese nur alle 2 - 3 Monate um. S o l t y s (1963) fand gewöhnlich nur bis zu einer Woche und nur manchmal bis zu einem Monat lebende Keime.

W e r n e r (1969) konnte nach 7 - 8-tägiger Aufbewahrung von *Bacteroides fragilis* im Brutschrank keine lebensfähigen Kulturen mehr finden. Bei Eggerthella-Stämmen fand er (1968) heraus, daß Reinkulturen unter aeroben Bedingungen schnell absterben. Im Kühlschrank (+ 4°C) konnte er sie tagelang, in Rosenow-Bouillonkulturen bei Laboratoriumstemperatur und mit Paraffin versiegelt 4 - 8 Wochen und in der Tiefkühltruhe mehrere Monate verlustfrei aufbewahren. 10 Tage alte bei + 37°C bebrütete Kulturen von *Bacteroides melaninogenicus* waren nicht mehr mit Erfolg überimpfbar. In Rosenow-Bouillon hielten sie sich unter einem Paraffinsiegel bei Zimmertemperatur länger als 2 Monate.

Nach B e e r e n s, S c h a f f n e r, G u i l l a u m e und J a s t e l (1933) konnten die von ihnen untersuchten Eggerthella-Arten + 50°C für 10 Minuten, nicht aber + 60°C 15 Minuten ertragen. Bei B e v e r i d g e (1934) überlebten seine *Bacillus-necrophorus*-Stämme + 55°C 15 Minuten nicht. Bei + 4°C waren alle Kulturen in Gehirn- und Leberbouillon nach 5 Wochen steril. Nur eine Kultur konnte 7 Wochen über-

leben. Auf frischen Serum-Agar-Platten blieben unter aeroben Bedingungen einige Stämme 14 Tage lang virulent. 24-stündige V.F.-Medium-Kulturen konnten aerob bei + 15°C 7 Stunden, nicht aber 24 - 48 Stunden verlustfrei aufbewahrt werden. Einige anaerob angezüchtete Kulturen ließen sich bis zu 3 Tagen weiterzüchten. Durch gemeinsame Verimpfung des *Neurospora* mit *Staph. aureus* und *E. coli* konnte die Überlebenszeit verlängert werden. Dieses Phänomen wurde von *Rewo* und *Shukowa* (1963) bestätigt. Sie geben als Überlebenszeit 15 Minuten bei einer Aufbewahrungstemperatur von + 65°C und 1 Minute bei + 100°C an. Direkte Sonneneinstrahlung ertragen die Keime nur 8 - 10 Stunden.

Hartwigk und *Tzimas* (1966) konnten nach 3-stündiger Luftwirkung eine deutliche Reduktion der Koloniezahlen feststellen. Nach 4 Stunden fanden sich nur wenige und nach 6 Stunden keine lebenden Keime mehr. 5 Tage lang bebrütete Lackmusmilchkulturen waren stets abgestorben. In Thioglykolat-Medium überlebten nach 15-tägiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur (+ 22°C) nur eine sehr geringe Zahl der Keime. Bei + 5°C waren noch nach 25 Tagen bei den Tierstämmen, bis zu 32 Tagen bei den Menschenstämmen trotz starker Reduktion lebende Keime zu finden. Sie (1968) setzten die Kulturen von Traubenzuckerblut-Agar alle 2 Wochen auf Thioglykolat-Medium um.

Haupt (1964) sah bei wöchentlicher Überimpfung von *Necrobacterium* keinen Wachstumsverlust. Hitchens-Agar-Kulturen sind bei + 60°C nach 20 Minuten nicht mehr überimpfbar.

In eingehenden Untersuchungen stellte *Orcutt* (1950) fest, daß das *Bacterium necrophorum* gegenüber Austrocknung empfindlich ist. Bei Zimmertemperatur trockneten die Serum-Agar-Kulturen unter aeroben Bedingungen nach bereits 1 - 3 Tagen ein, so daß keine überlebenden Keime mehr gefunden werden konnten. Dabei haben sich jüngere Kulturen als resistenter erwiesen als alte: 3 Tage alte Kulturen waren nach

1 - 3 Tagen, 14 Tage alte Kulturen schon nach 2 - 15 Stunden steril. + 60°C wurden nur 1 - 3 Minuten ertragen. S p a u l - d i n g und R e t t g e r (1937) fanden ältere Kulturen weniger sauerstoffempfindlich als junge.

R o s e n (1970) beschreibt eine sehr starke Empfindlichkeit der Keime gegenüber Sauerstoff. + 55°C für 15 Minuten und + 37°C und + 40°C für 1 Woche lassen die Kulturen absterben. Durch Staph. aureus und E. coli können bei gleichzeitiger Verimpfung die Überlebenszeiten verlängert werden.

Nach S c h o o p (1939) können Nekrosebakterien auf Serum-Agar unter aeroben Bedingungen nicht länger als 18 bis 24 Stunden aufbewahrt werden. Unter Luftabschluß können nach 14 Tagen die Kulturen noch gut, nach 24 Tagen und länger nur selten und nach 34 Tagen nicht mehr überleben. In Serum- und Blutbouillon hielten sie sich etwas länger. •

Bei F e l d m a n n, H e s t e r und W h e r r y (1936), die das Rosenow-Medium benutzten, waren alle Kulturen abgestorben, wenn man sie 30 Minuten bei + 55°C aufbewahrte. H i n e und B e r r y (1937) geben für die Gattung Fusiformis an, daß auf Koch-Fleisch-Nährmedium + 60°C und + 56°C 5 Minuten, + 52°C 10 Minuten und + 50°C 15 Minuten lang nicht ertragen wurden.

E i g e n e U n t e r s u c h u n g e n

I. Material und Methodik

1. Material

a. Menschen-Stämme:

Es kamen 4 Menschenstämme zur Anwendung, von denen 2 (Fr und Var) 1966 von der American Type Collection bezogen wurden. Der Stamm Fr wurde inzwischen von Herrn Werner (Bonn) ebenfalls als *Sphaerophorus varius* differenziert. Herr Dr. Hussels (Berlin) stellte uns den Stamm A und Herr Dr. Lodenkämper (Hamburg) den Stamm 3608 zur Verfügung. Bei beiden Stämmen dürfte es sich um *Sphaerophorus varius*-Stämme handeln.

b. Tier-Stämme:

Die verwendeten Stämme wurden in den Jahren 1965/66 aus Entzündungsprozessen von Rindern (4 Stämme), Hund, Kaninchen (je 1 Stamm), Huhn und Goldhamster (je 2 Stämme) gewonnen. Die Rinderstämme R_1 - R_4 wurden aus entzündlichem Klauenmaterial an Panaritium erkrankter Rinder isoliert. Aus einer nekrotisierenden Orchitis eines Hundes stammt der Hundestamm Hd. Der Kaninchenstamm 1138 wurde aus einem etwa walnußgroßen Abszeß am Nasenrücken gewonnen. Er wurde von Herrn Werner als ein *Sphaerophorus varius*-Stamm identifiziert. H_1 und H_2 sind Hühnerstämme. Während H_1 aus Pockendiphtheroid-Material isoliert wurde, stammt H_2 aus dem schleimigen Sekret eines an Sinusitis erkrankten Tieres. Beide Goldhamsterstämme L_4 und Wilk fanden sich in nekrotisierenden Bißwunden in der Haut. Außer dem Kaninchenstamm (1138) wurden alle Tierstämme von Werner als *Bacteroides thetajoetaomicron*-Stämme differenziert.

Es darf nicht unerwähnt bleiben, daß diese Stämme in den vergangenen Jahren wiederholt erst nach mehreren

Wochen überimpft wurden. Einige waren erst nach vielen Bemühungen wieder zu brauchbaren Kulturen angereichert worden, nachdem ein großer Teil der Keime abgestorben war. Außerdem bedurfte es großer Sorgfalt, die Kulturen vor Verunreinigungen zu schützen.

c. Ammenstämme:

Bei der Auswahl der Stämme wurde auf gutes Wachstum unter anaeroben Bedingungen geachtet. Die Stämme sollten außerdem eine unterschiedlich starke Hämolyse zeigen. Isoliert wurden sie vorwiegend aus Material, das von der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere (Direktor: Prof. Dr. L. F. Müller) zur Antibiotika-Testung eingeschickt worden war. Sie wurden nicht näher differenziert.

Die beiden Staph. albus-Stämme hämolysierten Schafblut nicht. Dagegen hämolysierten die beiden Staph. aureus-Stämme Schaferythrozyten stark. Drei E. coli-Stämme mit schwacher Hämolyse wurden einem Stamm mit starker Hämolyse gegenübergestellt. Außerdem kamen vier Schaferythrozyten schwach und zwei stark hämolysierende Ps. aeruginosa-Stämme zur Verwendung.

d. Benutzte Nährmedien:

Zur Untersuchung der Wachstumsintensität und ihrer Beurteilung auf verschiedenen Nährböden kamen insgesamt 23 Nährbodenarten zur Anwendung. Bei der Auswahl ging ich von Mitteilungen in der Literatur aus. Die Prüfung einer Wachstumsförderung durch den X- oder V-Faktor wurde nicht nur durch den Plättchentest, sondern auch durch einen, beide oder keinen Faktor enthaltende Nährböden durchgeführt. Hier wählte ich u. a. auch die von Haupt (1964) angegebene Methode.

2. Methodik

a. Technik der Beimpfung:

Die Stämme wurden von Traubenzuckerblut-Agar-Platten in 15 ml Thioglykolat-Hochschicht-Medium überimpft, indem ein etwa 5 mm² großes, dicht bewachsenes Agarstück mit der Platinöse entnommen und in die Mitte der Flüssigkeitssäule versenkt wurde.

Nach 48-stündiger Bebrütung bei + 37°C im Brutschrank wurde die Kultur mit einer sterilen Pipette durchmischt, so daß eine möglichst gleichmäßige Verteilung der Keime erreicht wurde. Hieraus wurde jeweils 0,1 ml auf feste Nährböden bzw. in die flüssigen Nährmedien pipettiert. Um ein möglichst gleichartiges Flächenwachstum auf den festen Nährböden zu erreichen, wurde das Inoculum mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Bei Überimpfung von einem festen Nährboden auf einen anderen mittels einer Platinöse kam es oft nur an einzelnen Stellen zu einem Wachstum von Kolonien, das sich in ein Bewertungsschema nicht einordnen ließ.

Die Menge des in die Petrischale eingegossenen Agars betrug in der Regel 10 ml. Zur Überprüfung der Überlebenszeit bei Aufbewahrung der Stämme wurden 15 ml als Eingußmenge verwendet; denn es hatte sich in Vorversuchen herausgestellt, daß die Schichtdicke in den Platten einen Einfluß auf die Überlebenszeit ausübt. Durch eine 24-stündige Aufbewahrung bei + 37°C wurden die Platten vor Beimpfung auf Sterilität geprüft.

Von den flüssigen und halbflüssigen Nährmedien wurden jeweils 15 ml in Glasröhrchen gegeben, die dann mit einem Zellstoffpfropfen verschlossen und anschließend autoklaviert wurden.

Bei mehrtägiger Aufbewahrung des Thioglykolat-Mediums unter aeroben Bedingungen färbte sich der obere Rand im Röhrchen zunehmend rosa. Nach einer Woche war bereits das obere Drittel der Flüssigkeitssäule gefärbt. Dies war offenbar durch die Absorption des Sauerstoffes aus der Luft bedingt. Kam es zu Verunreinigungen der Kulturen durch aerob oder fakultativ anaerob wachsende Bakterien, so entfärbte sich der Ring stets innerhalb weniger Stunden nach Bebrütung bei + 37°C. Dies wurde auch bei den stark gasbildenden Menschen-Stämmen des *Sphaerophorus varius* beobachtet.

b. Herstellung der Anaerobiose:

Zur Herstellung einer zuverlässigen Anaerobiose wurde die modifizierte Bierfilzmethode nach Ott angewandt. Sie hatte sich im hiesigen Institut bereits seit Jahren wegen ihrer Einfachheit und Zuverlässigkeit bewährt.

c. Färbung und Kontrolle auf Reinheit der Kulturen:

Vor jeder Beimpfung einer Platte oder eines flüssigen Mediums wurde die Kultur auf ihre Reinheit geprüft. Zunächst wurden die Kolonien unter dem Plattenmikroskop ausgesucht. Die einzelnen Stämme wurden dann nach Gram gefärbt. Außerdem wurde geprüft, ob Wachstum auch unter aeroben Bedingungen zu beobachten war. Die Entfärbung des roten Ringes am oberen Rand des flüssigen Thioglykolat-Mediums sowie Wachstum auf Traubenzuckerblut-Agar unter aeroben Bedingungen waren zuverlässige Indikatoren für eine Verunreinigung.

d. Beurteilung:

Das jeweils benutzte Inokulum konnte nicht auf eine bestimmte Keimzahl standardisiert werden. Hier spielten technische Schwierigkeiten eine entscheidende Rolle. Fast alle Autoren berichteten, daß die Keime strikt anaerob wachsen und bereits durch den Kontakt mit freiem Sauerstoff in ihrer

Wachstumsintensität geschädigt werden. Auch scheinen sich die fädigen Elemente in eine unterschiedliche Zahl einzelner Bakterien zu teilen. Schließlich erforderte es eine außerordentliche Sorgfalt, die Kulturen von Verunreinigungen freizuhalten. Die Beurteilung erfolgte nach 48-stündiger Bebrütung. Auf festen Nährböden wurden folgende Bewertungsgrade angenommen:

- +++ : dichter, feiner Kolonienrasen auf dem größten Teil der Oberfläche
- ++ : nicht geschlossener Kolonienrasen
- + : vereinzelte Kolonien
- : kein Wachstum

In den gewöhnlichen, für *Sphaerophorus varius* und *Bacteroides thetaotaomicron* vorgesehenen flüssigen Nährmedien ließ sich die Wachstumsintensität nicht beurteilen. Dies lag meist an deren Eigentrübung (z.B. Rosenow-Medium). Lediglich in Thioglykolat, in dem das Wachstum watteflockenartig erschien, konnte man die Stärke des Wachstums an der Größe der Eintrübungszone gut feststellen. Bei den übrigen flüssigen Medien wurde die Trübungsintensität als ungefährender Maßstab herangezogen.

II. Ergebnisse

1. Einfluß des Nährmediums auf das Wachstum

a. Morphologische Eigenschaften:

Bei der routinemäßigen Untersuchung der Stämme auf Reinheit wurden auch ihre morphologischen Eigenschaften untersucht. Die humanen Stämme zeigten hauptsächlich kokkoide Formen. Daneben fanden sich bei den Stämmen A, Var und 3608 mehr oder weniger lange Stäbchen oder Fäden, die bei dem Stamm Fr nicht auftraten. Bei den Tierstämmen fanden sich ausschließlich mehr oder weniger lange Fäden oder Stäbchen. In älteren Thioglykolat-Kulturen verkürzten sich die Fäden bzw. Stäbchen, bis sie schließlich kokkoid er-

schienen. Schon nach einmaliger Verimpfung nahmen sie wieder ihre ursprüngliche Form an. Auch in älteren Traubenzuckerblut-Agar-Kulturen konnten kokkoide Formen dieser Stämme nachgewiesen werden.

Alle Stämme waren unbeweglich und bildeten keine Sporen. Auffallend war die starke Pleomorphie. An den Stäbchenenden zeigten sich bei allen Stämmen leichte Auftreibungen und Anschwellungen. Besonders die fusiformen Keime schienen sich Y-förmig zu verzweigen.

Bei allen Tier- und Menschenstämmen kamen unregelmäßig häufig teilweise freie Sphäroblasten vor. Die Einflüsse, von denen die Sphäroblastenbildung abhängig war, konnten nicht festgestellt werden. Sie war unabhängig von dem jeweiligen Nährmedium sowie von der Bebrütungsdauer.

b. Anfärbung

Alle Stämme waren gramnegativ. Auch durch Karbolthionin und Löfflers Methylenblau wurden die Elemente gut gefärbt. Charakteristisch ist eine starke Metachromasie. Durch Farbaussparungen und dunkel gefärbte Pole wird der Eindruck einer Sporenbildung hervorgerufen. Durch dunklere Granula und Farbaufhellungen werden eisenbahnschienenähnliche Bilder erzeugt. Die Sphäroblasten waren entweder peripher oder zentral granuliert und im übrigen homogen gefärbt.

c. Wachstumseigenschaften:

1. Wachstum auf Traubenzuckerblut-Agar:

Wenn 0,1 ml einer Thioglykolat-Kultur auf einer Platte mit einem Drigalski-Spatel ausgestrichen wurden, so bildete sich stets ein dichter Bakterienrasen, auf dem einzelne Kolonien nicht beurteilt werden konnten. Deswegen wurde die Beimpfung mit einer Platinöse durchgeführt. Auf diese Weise konnten einzelne Kolonien wachsen und beschrieben werden.

Die Einzelkolonie war 0,5 - 1,0 mm im Durchmesser groß. Wurde die Anaerobiose im Anaerobiergefäß nach Brewer hergestellt, so wuchsen die Kolonien bei gleicher Bebrütungs-dauer um etwa $1/4$ bis $1/2$ mal größer als bei der Bierfilz-methode. Die scharf abgesetzten glatten Ränder zeigten bei älteren Kulturen feine, faserige Ausläufer. Die Oberfläche erschien unterschiedlich stark konvex, die Farbe grauweiß. Waren die Kulturen längere Zeit der Luft ausgesetzt, so wurden sie grau und an der Oberfläche trocken.

Bei der Öffnung der Petrischalen konnte stets ein charakteristischer fauliger Geruch festgestellt werden.

2. Wachstum in Thioglykolat-Medium, Leberbouillon und Rosenow-Medium:

Die Beimpfung erfolgte mit der Agarblockmethode. Während sich die Leberbouillon nach 48 Stunden gleichmäßig getrübt hatte und in den Röhrchen ein stecknadelkopf- bis linsengroßer grauweißer Bodensatz entstand, gestaltete sich das Wachstum in Thioglykolat erheblich anders und differenzierter. Von dem Agarblock ausgehend, der in die Mitte der Flüssigkeitssäule mittels einer Platinöse verbracht wurde, zogen lange watteartige Fäden nach unten und seitlich und trübten nach 48 Stunden mehr als die Hälfte der Nährbodensäule. Bei den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) war bereits nach 24 Stunden optimales Wachstum mit vollständiger Trübung, Bildung eines linsengroßen weißen Bodensatzes und heftiger Gasbildung, erkennbar durch viele kleine aufsteigende Bläschen und Schaumbildung, erreicht. Selbst die rötlichen Zonen im oberen Drittel der Röhrchen verschwanden und wurden durch das Wachstum eingetrübt. Auch bei den übrigen (Tier-) Stämmen war - allerdings erst nach 48 Stunden - eine leichte Gas- und Bodensatzbildung zu beobachten. Die rötliche Zone blieb aber in jedem Fall erhalten, und es konnte hier auch kein Wachstum festgestellt werden. Eine vollständige Trübung durch die Tierstämme wurde auch bei mehrtägiger Bebrütung in keinem Fall erreicht. An der oberen

Grenze des Wachstums konnte ein feines graues Häutchen beobachtet werden, das sich bei mehrtägiger Aufbewahrung der Kultur im Kühlschrank noch verstärkte.

Im Rosenow-Medium machte sich das Wachstum durch eine gleichmäßige Trübung bemerkbar. Dieses konnte jedoch nur sehr ungenau beurteilt werden, weil das Medium eine gewisse Eigentrübung besitzt. Auffällig war jedoch eine Rotfärbung bei den Rinderstämmen ($R_1 - R_4$), den Hühnerstämmen (H_1, H_2), dem Hundestamm (Hd) und den beiden Goldhamsterstämmen (L_4 , Wilk) - also bei allen *Bacteroides thetaiotaomicron*-Stämmen -, die durch eine Senkung des pH-Wertes und damit durch den Andrade-Indikator hervorgerufen wurde. Bei allen vier Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) und dem Kaninchenstamm (1138) blieb das Medium grau.

3. Gasbildung:

Die H_2S -Bildung wurde in Thioglykolat-Medium geprüft. Ein Streifen Fließpapier wurde in Bleiacetat getränkt und anschließend so in das Röhrchen eingeklebt, daß es die Flüssigkeitssäule nicht berührte. Während bei den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) bereits nach 24 Stunden so heftige H_2S -Bildung zu erkennen war, daß sich eine etwa 5 mm breite schaumige Zone am oberen Rand des Mediums abhob und das Fließpapier sich intensiv schwarz färbte, war bei den Tierstämmen nach 48 Stunden nur das Aufsteigen einzelner Bläschen zu beobachten. Die Gasbildung verstärkte sich auch bei mehrtägiger Bebrütung nicht mehr, und das Bleiacetattapier färbte sich nur etwas grau.

4. Hämolyse:

Alle Stämme zeigten auf Traubenzuckerblut-Agar nur schwache, oft kaum sichtbare und nur schwer zu beurteilende Hämolyse. Diese wurde nach mehrstündiger Aufbewahrung im Kühlschrank deutlicher, weil der Nährboden sich braun färbte, während sich die Hämolysezonen weiter aufzuhellen schienen.

5. Extrazelluläre Desoxyribonuklease:

Nach vorläufigen Untersuchungen von W e r n e r (1968) an 100 Eggerthella- und 7 Sphaerophorus-Kulturen wurden nur bei den Eggerthella-Stämmen extrazelluläre Desoxyribonuklease festgestellt. Bei den Sphaerophorus-Arten fehlte dieses Enzym. Er glaubte, hiermit ein differentialdiagnostisch verwertbares Merkmal zur Hand zu haben. W e r n e r und M ü l l e r (1971) fanden jedoch bei Sphaerophorus necrophorus, nicht aber Sphaerophorus varius DNase-Aktivität.

Zum Nachweis des Enzyms bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämmen benutzte ich mit Methylgrün gefärbte DNase-Agar-Platten. 1,0 ml einer 0,5 %igen Methylgrünlösung waren 100 ml DNase-Agar (Oxoid) zugesetzt. Die Stämme wurden von Traubenzuckerblut-Agar-Kulturen mittels einer Platinöse überimpft, indem eine reichliche Öse voll Keimmaterial in ca. 3 cm langen Impfstrichen auf die DNase-Agar-Platte aufgebracht wurde. Nach dem Verschluss erfolgte 48-stündige Bebrütung bei 37°C. Die Versuche wurden wiederholt und auch mit drei-, vier- und fünftägiger Bebrütungsdauer durchgeführt.

Nach dem Öffnen zeigten sich um die Impfstriche herum Aufhellungszonen, die bei den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) und dem Kaninchenstamm (1138) 8 - 10 mm, bei den übrigen Tierstämmen jedoch nur 2 - 4 mm breit waren. Die Aufhellungszonen vergrößerten sich nicht durch die Verlängerung der Bebrütungszeit über 72 Stunden hinaus, die bei den Bacteroides thetaotaomicron-Stämmen aber auch notwendig war, um eine deutliche Aufhellung des DNase-Agars zu erreichen. Die Entfärbung verstärkte sich deutlich, wenn die Platten nach ca. 1 Stunde auf Zimmertemperatur abgekühlt waren. Sie veränderte sich dann auch nach mehrtägiger Aufbewahrung im Kühlschrank nicht mehr.

d. Wachstumsintensität:

Es kamen insgesamt 13 feste Nährböden zur Prüfung. 0,1 ml einer flüssigen Thio glykolat-Kultur wurde mit dem Drigalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Nach Verschluss der Petrischale erfolgte 48-stündige Bebrütung. Die Beurteilung wurde nach dem oben angegebenen Schema durchgeführt. Die benutzten Nährböden und die Ergebnisse zeigt nachstehende Übersicht:

Wachstum	Nährbodenarten
+++	Traubenzuckerblut-Agar (nach Zeissler, mit 10 % defibriniertem Hammelblut)
++	Hammelblut-Agar (ohne Traubenzucker)
++	Pferdeserum-Agar (ohne den V-Faktor, der durch 30-minütiges Erwärmen auf 56°C zerstört wurde)
++	Pferdeserum-Agar (nicht erhitzt, also mit dem V-Faktor)
++	Kochblut-Agar (im Autoklav vom V-Faktor befreit)
++	Hefeextrakt-Zystein-Blut-Agar (nach Deereus; anstelle von Pferdeblut wurde Schafblut verwendet)
+	Zystein-Laktose-Leber-Agar (Blaurock-Agar)
+	Proteose-Agar Nr. 3 Difco (ohne X- und V-Faktor)
+	gewöhnlicher Agar
-	Gelatine-Agar
-	Ammonphosphat-Agar
-	Conradi-Drigalski-Agar
-	Colamin-Agar

Der Traubenzuckerblut-Agar nach Zeissler hat sich als der eindeutig beste Nährboden herausgestellt. Ohne Traubenzucker war das Wachstum schon weniger intensiv. Aber auch auf den anderen blut- oder serumhaltigen Böden konnte eine

recht gute Wachstumsintensität festgestellt werden. Der Vergleich zwischen dem den V-Faktor enthaltenden unerhitzten Pferdeserum-Agar mit dem erhitzten zeigte keinen ablesbaren Unterschied in der Wachstumsförderung. Auch auf dem Kochblut-Agar, der den V-Faktor nicht besitzt, war das Wachstum nicht vermindert.

Weniger günstig war dagegen der Proseose-Agar, dem der X- und V-Faktor fehlt. Es wuchsen hier nur vereinzelte Kolonien, die zudem kleiner waren als die Kolonien auf anderen Nährböden. Ob der fehlende X-Faktor hierfür verantwortlich war, mußte sich erst im Plättchentest erweisen.

Zystein, das sowohl im Hefeextrakt-Zystein-Blut-Agar (nach Beerens) als auch im Blaurock-Agar enthalten ist, schien keinen fördernden Einfluß auf die Keime zu haben. Dagegen bewirkte der Hefeextrakt eine Wachstumsförderung.

Während auf gewöhnlichem Agar bei allen Stämmen - außer bei den beiden Goldhamsterstämmen L₄ und Wilk, die in keinem Fall anzüchtbar waren - nur geringes, schwer zu beurteilendes und nicht regelmäßig wiederholbares Wachstum festzustellen war, wuchs auf Gelatine-, Ammonphosphat-, Conradi-Drigalski- und Colamin-Agar auch nach 8 - 10-tägiger Bebrütung kein Stamm mehr.

Die Wachstumsintensität versuchte ich auch in 6 verschiedenen, vor der Beimpfung ausgekochten flüssigen Nährmedien zu bestimmen. 0,1 ml einer Thioglykolat-Kultur wurde etwa in die Mitte der Flüssigkeitssäule pipettiert. Nach dem Verschuß mit einem Zellstoffpfropf erfolgte eine 48-stündige Bebrütung bei 37°C. Die Beurteilung des Wachstums in den verschiedenen Nährmedien zeigt nachstehende Übersicht:

Wachstum	Nährmedium
+++	Thioglykolat-Medium (Oxoid)
++	Leberbouillon
++	Rosenow-Medium
++	Serumbouillon
++	Traubenzuckerbouillon
++	Leber-Leber-Bouillon mit 1 % Pferdeserum
++	gewöhnliche Nährbouillon mit 1 % Pferdeserum
+	gewöhnliche Nährbouillon

Hier hat sich also das Thioglykolat-Medium als optimal erwiesen. Aber auch in den anderen benutzten Medien konnte gutes Wachstum erzielt werden. Allerdings mußte gewöhnliche Nährbouillon durch einen Zusatz von 1 % Serum verbessert werden.

Zusammenfassendes Ergebnis:

Von den festen Nährböden hat sich am besten Traubenzuckerblut-Agar bewährt, als flüssiges Medium war Thioglykolat optimal. Die Keime erwiesen sich als hämo- und serophil.

2. Wachstumsförderung durch Zusätze zum Nährmedium

a. Einfluß des X- und V-faktors (Plättchentest)

Es hatte sich schon bei der Untersuchung der Wachstumsintensität auf den Nährböden, die entweder den X- oder V-Faktor, oder beide oder keinen der Faktoren enthielten, gezeigt, daß beide Faktoren für die benutzten Keime nicht essentiell waren. In diesem Versuch wurde geprüft, ob eine graduelle Wachstumsbeeinflussung zu verzeichnen ist. Hierfür verwendete ich mit den jeweiligen Faktoren imprägnierte Plättchen der Firma Oxoid. Wieder wurden die verwendeten Nährböden mit 0,1 ml einer Thioglykolat-Kultur beimpft, die mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen wurde. Nachdem die flüssige Phase in den Boden diffundiert war, wurden die Plättchen unter sterilen Kautelen auf die beimpfte Fläche aufgelegt und

mit der Pinzette leicht festgedrückt. Es folgte der Verschuß und 48-stündige Bebrütung bei 37°C.

Der Plättchentest wurde auf allen oben angegebenen festen Nährböden durchgeführt, auf denen sehr gutes, gutes oder nur geringes Wachstum zu erzielen war. Auf diese Weise konnte ich feststellen, ob das Wachstum auf Traubenzuckerblut- und Serum-Agar, die sowohl den X- als auch den V-Faktor enthielten, durch die imprägnierten Plättchen weiter gefördert wurde. Rund um und unter den Plättchen hätten sich bei einer Förderung ein üppiges Wachstum und größere Kolonien zeigen müssen. Beides war jedoch nicht der Fall.

Es ist nicht auszuschließen, daß eine Wachstumsförderung deswegen nicht zu erzielen war, weil in beiden Nährböden X- und V-Faktor im Überfluß vorhanden sein könnten. Deswegen wurde der Plättchentest auch auf solchen Nährböden, denen die Faktoren ganz oder teilweise fehlten, durchgeführt. Doch konnte auch auf ihnen keinerlei Wachstumsförderung festgestellt werden. Insbesondere fiel auf, daß in keinem Fall und auf keinem Nährboden gewachsene Kolonien unter den Testplättchen beobachtet werden konnten, so daß sogar statt an eine Wachstumsförderung an eine Wachstums-
hemmung durch die Plättchen zu denken ist.

b. Ammonwachstum

Die Versuche wurden zunächst auf Traubenzuckerblut-Agar durchgeführt. Die Ammonstämme wurden mittels einer Pipette aus einer Thioglykolat-Kultur in die Mitte einer Traubenzuckerblut-Agar-Platte übertragen und ausgestrichen. Auf diese Weise konnte ich auf dem 5 mm breiten Impfstrich, der sich senkrecht von dem einen Rand der Petrischale zum anderen erstreckte, ein möglichst gleichmäßiges Wachstum erzielen. Nach 15 Minuten war das Thioglykolat in den Boden diffundiert, wobei sich die seitlichen Grenzen des Impfstriches deutlich von der Umgebung abhoben.

Von den Traubenzuckerblut-Agar-Kulturen entnahm ich mittels einer Platinöse 4 - 5 Kolonien der Sphaerophorus- bzw. Bacteroides-Stämme und führte die Impfstriche von rechts und links bis auf 3 mm so an den Impfstrich der Ammen heran, daß diese mit jenen einen rechten Winkel bildeten.

Zur Verdeutlichung und Sicherung der Ergebnisse impfte ich umgekehrt auch die Sphaerophorus- und Bacteroides-Stämme aus Rhizoglykolat-Kulturen mit der Pipette in Strichform auf die Mitte des Nährbodens und führte mit der Platinöse die Ammen im rechten Winkel an diese heran. Es wurde also einerseits der Einfluß einer Ammenkultur auf alle Sphaerophorus- und Bacteroides-Stämme, andererseits die Beeinflussung jeder einzelnen Kultur durch alle Ammen untersucht. Das Ergebnis mußte in jedem Fall übereinstimmen, jedoch wurde so ein nur zufällig besseres Wachstum durch eine größere Zahl überimpfter Keime bemerkt. In Zweifelsfällen wurden die Versuche mehrfach wiederholt.

Da auch hier, wie bei dem Plättchentest, nicht auszuschließen war, daß bereits der Traubenzuckerblut-Agar das Wachstum optimal förderte, wurden die Versuche auf erhitztem Serum-Agar (ohne K-Faktor), Proteose-Agar Nr. 3 Difco und gewöhnlichem Nähragar (ohne K- und V-Faktor) durchgeführt. Die Ergebnisse unterschieden sich jedoch nicht von den Ergebnissen, die ich auf Traubenzuckerblut-Agar-Platten erzielte.

Während die E. coli- und Ps. aeruginosa-Ammen keinerlei Einfluß hatten, hemmten die hämolysierenden Staphylokokken das Wachstum aller Sphaerophorus- und Bacteroides-Stämme im Bereich ihrer Hämolyszone total. Dieses Phänomen wurde offenbar durch die Hämolysine hervorgerufen, die von den Staph. aureus-Arten gebildet werden.

Durch die beiden Staph. albus-Stämme wurden die Hämolysazonen der Bacteroides thetaiotomicron-Stämme - nicht jedoch die der Sphaerophorus varius-Stämme - deutlich verstärkt. Ein dichteres Wachstum oder größere Kolonien wurden aber auch durch diese Ammenstämme nicht erreicht.

c. Einfluß durch Rindergalle:

Nach W e r n e r (1969) hat der Nachweis der Wachstumsförderung durch Rindergalle für die beim Menschen vorkommenden Eggerthella-Stämme die größte Bedeutung.

Als Nährmedium dient eine Hefeextrakt-Zystein-Base mit 2 g Glukose, 6 g BactoAgar Difco in 1000 ml Aqua dest.. Das Substrat wird in Mengen von 4,5 ml in Röhrchen abgefüllt und autoklaviert. Vor dem Gebrauch erfolgt eine Erhitzung bis zur Verflüssigung und Abkühlung auf + 50°C, um dann 0,5 oder 1,0 ml folgender Lösung hinzuzufügen:

sterile Rindergalle 100 ml

Natriumdesoxycholat 0,5 g

In gleicher Weise werden 2 - 3 Röhrchen ohne Zusatz von Rindergalle und Natriumoxycholat als Kontrollen verwendet.

Die Beimpfung der auf + 50°C abgekühlten Röhrchen wird mit einer 24 - 48-stündigen Rosenow-Bouillon-Kultur mit einer Pasteurpipette vorgenommen.

Trotz wiederholter Kultur-Ansätze und sorgfältiger Vergleiche mit und ohne Rindergalle-Natriumdesoxycholat war es mir nicht möglich, bei den in vorliegender Arbeit verwendeten Menschen- und Tierstämmen von Sphacrophorus varius und Bacteroides thetajoamicron eine Förderung durch Zusatz von 10 oder 20 % Rindergalle zu beobachten.

d. Einfluß von Fildes-Extrakt:

Oxoid-Fildes-Extrakt (1920) stellt eine reiche Quelle von Wachstumsfaktoren dar, einschließlich Hämatin und Coenzymen, die sich von roten Blutzellen, mit denen der Extrakt hergestellt wird, ableiten. Außer dem X-Faktor sind die Wachstumsfaktoren hitzelabil.

Der Extrakt ist mit Chloroform konserviert, das durch Aufbewahrung bei + 55°C während 30 Minuten bei geöffneten Verschlüssen zur Verdunstung gebracht wird.

Der Extrakt wurde 10 ml Leberbouillon (ohne Leberstückchen in Mengen von 0,3 , 0,2 und 0,1 ml zugefügt.

Sphaerophorus varius- und Bacteroides thetajoatomicon-Stämme vermehrten sich in der Leberbouillon relativ gut, wenn die Bouillon mit 0,1 ml Kultur beimpft und das Röhrchen nach Erhitzung des oberen freien Teils in der Bunsenflamme mit einem sterilen Gummistopfen fest verschlossen wurde.

Wiederholte Versuche, das Wachstum der in vorliegender Arbeit benutzten Sphaerophorus varius- und Bacteroides thetajoatomicon-Stämme durch unterschiedliche Mengen des Fildes-Extraktes zu verbessern, führte zu einem negativen Ergebnis. Es läßt sich demzufolge eine Verbesserung des Wachstums dieser Stammarten durch den Fildes-Extrakt nicht erreichen.

Zusammenfassendes Ergebnis:

So wichtig für die Förderung des Wachstums der Stämme von Sphaerophorus varius und Bacteroides thetajoatomicon der Zusatz von Blut zum Traubenzucker-Agar ist, so wenig war es möglich zu beweisen, daß der X- oder V-Faktor einen fördernden Einfluß auf das Wachstum der verwendeten 14 Stämme hatte. Auch war es nicht möglich, durch hämolysierende und nicht hämolysierende Staphylokokken oder E. coli-Stämme oder Stämme von Ps. aeruginosa als Ammen einen positiven Effekt auf das Wachstum zu erzielen. Ebenso förderte der Zusatz von 10 oder 20 % Rindergerste das Wachstum nicht. Gleiches war der Fall bei Fildes-Extrakt, der in Mengen von 0,1 , 0,2 und 0,3 ml zu 10 ml Leberbouillon zugesetzt wurde.

3. Überlebenszeit bei Aufbewahrung der Stämme bei verschiedenen Temperaturen und in verschiedenen Nährmedien

Die Überlebenszeit wurde in den flüssigen Nährmedien Thioglykolat, Leberbouillon und Rosenow-Medium, die zu je 15 ml in Glasröhrchen abgefüllt wurden, sowie auf Traubenzuckerblut-Agar-Platten untersucht. Von dem Traubenzuckerblut-Agar wurde einmal 10 ml und zum anderen 15 ml in die Petrischalen eingegossen. Neben dem Einfluß des Nährmediums auf die Lebensdauer der Kulturen sollte auch die Überlebensdauer bei verschiedenen Aufbewahrungstemperaturen registriert werden.

Jeweils 0,1 ml einer Thioglykolat-Kultur wurden in die mit 15 ml des jeweiligen flüssigen Nährmediums gefüllten Glasröhrchen bzw. auf die Traubenzuckerblut-Agar-Platten pipettiert. Auf den Platten wurde das Inokulum mit dem Drigalski-Spatel gleichmäßig ausgestrichen. Die Petrischalen und Glasröhrchen wurden verschlossen und bei + 37°C bebrütet. Nach 48 Stunden wurden die Platten geöffnet und die Bierfilze entfernt.

Die Röhrchen und Platten wurden in drei gleich große Gruppen geteilt, um sie dann bei + 4°C, + 22°C und + 37°C aufzubewahren. Für jeden verwendeten Stamm wurden also insgesamt 15 Versuche angesetzt.

Bei wiederholter Entnahme von Material aus einer Kultur sind trotz aller Vorsichtsmaßnahmen Verunreinigungen nicht immer zu vermeiden. Deswegen wurden für jeden Versuch Ersatzröhrchen und -platten beimpft.

Die Beurteilung der Wachstumsintensität erfolgte erstmals nach 48-stündiger Bebrütungszeit (1. Tag), dann am 3., 5., 9., 14., 20. Tag und weiterhin alle 10 Tage. Es wurden 0,1 ml aus den Röhrchen entnommen und auf einer Traubenzuckerblut-Agar-Platte gleichmäßig ausgespatelt. Bei den Platten wurde die noch vorhandene Wachstumsintensität geprüft, indem eine reichliche Platinöse voll Keimmateriale entnommen und auf

einem Viertel einer Traubenzuckerblut-Agar-Platte in dichten Impfstrichen aufgebracht wurde. Nach Herstellung der Anaerobiose und nach 48-stündiger Bebrütung bei + 37°C erfolgte die Beurteilung der Wachstumsintensität nach dem oben angegebenen Schema. Die Ergebnisse sind den folgenden Übersichten zu entnehmen.

Übersicht 1

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (10 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 37°C

Tag		
Stamm	1.	3.
R ₁	+++	-
R ₂	+++	-
R ₃	+++	-
R ₄	+++	-
H ₁	+++	-
H ₂	+++	-
Hd	+++	-
L ₄	+++	-
Wilk	+++	-
1138	+++	-
Fr	+++	-
Var	+++	-
A	+++	-
3608	+++	-

Nach 48-stündiger Bebrütung war das Wachstum bei allen 14 Stämmen optimal. Am 3. Tag nach Öffnen der Platten und Aufbewahrung bei + 37°C unter aeroben Bedingungen war der Nährboden vollständig eingetrocknet, so daß eine Entnahme von Kulturmateriail zur Beimpfung frischer Platten nicht mehr möglich war.

Übersicht 2

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 37°C

	Tag		
Stamm	1.	3.	5.
R ₁	+++	-	-
R ₂	+++	-	-
R ₃	+++	-	-
R ₄	+++	-	-
H ₁	+++	-	-
H ₂	+++	+	-
Hd	+++	-	-
L ₄	+++	-	-
Wilk	+++	-	-
1138	+++	-	-
Fr	+++	+	-
Var	+++	+	-
A	+++	-	-
3608	+++	-	-

Durch die größere Eingußmenge war die Eintrocknungszeit verlängert. So konnte noch nach 3 Tagen auf Traubenzuckerblut-Agar-Platten bei den Stämmen H₂, Fr und Var ein schwaches Wachstum erzielt werden. Am 5. Tag nach dem Öffnen der Platten war auch hier der Nährboden vollständig eingetrocknet, so daß eine Entnahme von Kulturmaterial für eine Überimpfung nicht möglich war.

Übersicht 3

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (10 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 22°C

Stamm	1. Tag	3.	5.	9.	14.	20.	30.	40.
R ₁	+++	+++	+++	++	++	++	-	-
R ₂	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
R ₃	+++	+++	+++	+	+	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	++	+	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	+	-	-	-	-
H ₂	+++	++	+	-	-	-	-	-
Hd	+++	+++	+++	++	+	+	-	-
L ₄	+++	+++	++	++	+	-	-	-
Wilk	+++	++	+	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
Fr	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
A	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
3608	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-

Das Wachstum von 11 Stämmen war nach 5-tägiger Aufbewahrung unter aeroben Bedingungen bei + 22°C noch optimal. Nur die Stämme H₂, L₄ und Wilk hatten eine geringere Wachstumsintensität. Am 9. Tag waren die Kulturen des Hühnerstammes H₂ und des Goldhamsterstammes Wilk abgestorben. Die längste Überlebenszeit von 30 Tagen war bei dem Rinderstamm R₂, dem Kaninchenstamm (1138) und dem Menschenstamm Var zu beobachten.

Übersicht 4

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 22°C

Tag									
Stamm	1.	3.	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.
R ₁	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
R ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
R ₃	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-
H ₂	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
Hd	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-
L ₄	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Fr	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
A	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
3608	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

Durch die dickere Schicht des Traubenzuckerblut-Agars in den Platten ließ sich die Überlebensfähigkeit der Stämme bei Aufbewahrung bei + 22°C unter aeroben Bedingungen nicht wesentlich verlängern. Nach 5 Tagen war noch bei allen Stämmen gutes bis sehr gutes Wachstum zu konstatieren. Auch nach 9 Tagen waren alle Stämme noch überimpfbar. Am 22. Tag nach dem Öffnen der Platten waren die beiden Hühnerstämme (H₁, H₂) und Goldhamsterstämme (L₄, Wilk) abgestorben. Bis zum 40. Tag ließ sich bei den Rinderstämmen R₁ und R₂, dem Hundestamm (Hd), dem Kaninchenstamm (1138) und den beiden Menschenstämmen Var und A nach Überimpfung noch ein geringes Wachstum erzielen.

Übersicht 5

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (10 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 4°C

	Tag											
Stamm	3.	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.
R ₁	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-	-
R ₂	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
R ₃	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-
R ₄	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+
H ₁	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-
H ₂	+++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-
Hd	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	+
L ₄	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
3608	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-

Nach 20-tägiger Aufbewahrung bei + 4°C konnte bei 10 Stämmen (R₃, R₄, H₁, L₄, Wilk, 1138, Fr, Var, A, 3608) noch ein optimales Wachstum erzielt werden. Die Überimpfung der übrigen 4 Stämme R₁, R₂, H₂ und Hd ergab ein schwächeres Wachstum. Außer dem Rinderstamm R₂ überlebten alle Kulturen 50 Tage. Der Rinderstamm R₄, der Hundestamm (Hd) und der Menschenstamm Fr konnten noch nach 90 Tagen erfolgreich überimpft werden.

Übersicht 6

Nährmedium: Traubenzuckerblut-Agar (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 4°C

Tag													
Stamm	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.	110.	120.	130.	
R ₁	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
R ₂	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
R ₃	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	
R ₄	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	
H ₁	+++	++	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	
H ₂	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	
Hd	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	-	-	
L ₄	+++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	
Wilk	+++	+++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	
1138	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	
Fr	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	
Var	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	
A	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	
3608	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-	-	-	

Eine Aufbewahrung der Kulturen bei + 4°C ergab eine längste Überlebenszeit aller Stämme von 50 Tagen, wobei allerdings die Stämme R₁ und R₂ nur noch ein geringes Wachstum zeigten. Diese Stämme und der Stamm L₄ waren nach 60 Tagen abgestorben. Nach 100-tägiger Aufbewahrung waren 6 weitere Kulturen (R₃, H₂, Hd, Wilk, Fr und A) nicht mehr zum Anwachsen zu bringen. Mit 130 Tagen überlebte der Rinderstamm R₄ am längsten.

Übersicht 7

Nährmedium: Thioglykolat (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 37°C

Tag				
Stamm	1.	3.	5.	9.
R ₁	+++	++	-	-
R ₂	+++	++	-	-
R ₃	+++	++	+	-
R ₄	+++	++	+	-
H ₁	+++	++	-	-
H ₂	+++	++	+	-
Hd	+++	++	-	-
L ₄	+++	++	-	-
Wilk	+++	++	-	-
1138	+++	++	+	-
Fr	+++	++	-	-
Var	+++	+++	+	-
A	+++	+++	+	-
3608	+++	++	+	-

Nach 48-stündiger Bebrütung war das Wachstum bei allen Stämmen optimal. Nach 3-tägiger Aufbewahrung hatte sich unter aeroben Bedingungen bei + 37°C die Wachstumsintensität bei 12 Stämmen (ausgenommen Var und A) vermindert. Am 5. Tag konnte nur noch bei 7 Stämmen (R₃, R₄, H₂, 1138, Var, A und 3608) geringgradiges Wachstum festgestellt werden.

Übersicht 8

Nährmedium: Thioglykolat (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 22°C

Tag												
Stamm	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.
R ₁	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
R ₂	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
R ₃	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₂	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
Hd	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
L ₄	+++	++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-
Fr	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	++	+	+
Var	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+
A	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-	-
3608	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-

Nach 20 Tagen war noch gutes bis sehr gutes Wachstum bei allen Stämmen festzustellen. Alle Kulturen überlebten 30 Tage. Nach 40 Tagen waren 3 Kulturen (R₄, H₂, L₄) und nach 50 Tagen 4 weitere Kulturen (R₂, H₁, Hd, Wilk) abgestorben. Am 60. Tag waren nur noch die Rinderstämme R₁ und R₃, der Kaninchenstamm (1138) und alle Menschenstämme (Fr, Var, A, 3608) überimpfbar. Am längsten - nämlich 100 Tage - überlebten die beiden Menschenstämme Fr und Var.

Übersicht 9

Nährmedium: Thioglykolat (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 4°C

Tag											
Stamm	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.	110.
R ₁	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+	+	-
R ₂	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-
R ₃	+++	++	++	++	++	++	+	-	-	-	-
R ₄	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-
H ₂	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-
Hd	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-
L ₄	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	+
A	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-
3608	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+

40 Tage wurden von 8 Stämmen ohne Verminderung der Wachstumsintensität überlebt. Die Rinderstämme R₁ und R₂, der Hühnerstamm H₂ und die beiden Goldhamsterstämme (L₄, Wilk) hatten noch gutes Wachstumsvermögen. Nur bei dem Rinderstamm R₄ war noch ein geringes Wachstum zu erzielen. 100 Tage wurden von dem Rinderstamm R₁, dem Hundestamm (Hd) und allen 4 Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) überlebt. Nach 110 Tagen war nur noch bei 3 Kulturen (Fr, Var, 3608) die Überimpfung möglich. 120 Tage wurden von keiner Kultur überlebt.

Übersicht 10

Nährmedium: Leberbouillon (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 37°C

Tag									
Stamm	1.	3.	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.
R ₁	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
R ₂	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
R ₃	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
R ₄	+++	+	+	+	+	+	-	-	-
H ₁	+++	+	+	-	-	-	-	-	-
H ₂	+++	+	+	+	-	-	-	-	-
Hd	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
L ₄	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
Var	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
A	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
3608	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-

Schon am 3. Tag nach der 48-stündigen Anfangsbebrütung waren 3 Kulturen (R₂, Hd, Wilk) abgestorben. Dagegen war das Wachstum bei den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) und bei dem Kaninchenstamm (1138) noch nach 14 Tagen optimal. Von den übrigen Tierstämmen konnten dann nur noch die Rinderstämme R₁ und R₄ angezüchtet werden. Diese Stämme waren nach 30-tägiger Aufbewahrung ebenfalls abgestorben. Am 40. Tag konnte bei den Stämmen 1138, A und 3608 nur noch schwaches Wachstum beobachtet werden. Am 50. Tag waren auch diese Stämme nicht mehr überimpfbar.

Übersicht 11

Nährmedium: Leberbouillon (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 22°C

	Tag											
Stamm	1.	3.	5.	7.	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.
R ₁	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-
R ₂	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-
R ₃	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
H ₂	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hd	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-	-	-	-
L ₄	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	-	-
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-
A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
3608	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+

In Leberbouillon überlebten die *Sphaerophorus varius*-Stämme (1138, Fr, Var, A, 3608) mit wenigstens 50 Tagen länger als die *Bacteroides thetaiotaomicron*-Stämme, bei denen höchstens 40 Tage (R₁ und R₄) und wenigstens 14 Tage (R₃, H₂, L₄) Wachstum festzustellen war. Am längsten überlebte der Menschenstamm 3608. Er war noch nach 80-tägiger Aufbewahrung bei + 22°C überimpfbar.

Übersicht 12

Nährmedium: Leberbouillon (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 4°C

Tag											
Stamm	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.
R ₁	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-
R ₂	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-
R ₃	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-
R ₄	+++	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-
H ₁	+++	++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₂	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Hd	+++	+++	+++	++	+	+	+	-	-	-	-
L ₄	+++	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
Fr	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
Var	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
A	+++	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-
3608	+++	++	++	+	+	+	+	+	-	-	-

Die Aufbewahrung bei + 4°C hatte keine wesentlich besseren Ergebnisse als die Aufbewahrung bei + 22°C. Bereits nach 14 Tagen war der Goldhamsterstamm L₄ nicht mehr überimpfbar, und der Hühnerstamm H₂ und der Goldhamsterstamm Wilk wiesen nur noch geringes Wachstum auf. Bei allen übrigen Stämmen war noch gutes bis sehr gutes Wachstum festzustellen. 50 Tage überlebten nur der Rinderstamm R₃, der Hundestamm (Hd) sowie die 5 *Sphaerophorus varius*-Stämme (1138, Fr, Var, A, 3608). Als einziger Stamm konnte nach 80 Tagen noch R₃ mit Erfolg überimpft werden.

Übersicht 13

Nährmedium: Rosenow-Medium (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 37°C

Tag												
Stamm	5.	9.	14.	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.
R ₁	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	-
R ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-	-	-
R ₃	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	++	+	-	-	-	-	-	-	-
H ₁	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+
H ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+	+	-
H ₃	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-
L ₄	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-	-	-	-	-
Wilk	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	-
1138	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	+
Var	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-
A	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
3608	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+

Das Wachstum war bei 13 Stämmen noch nach 2-wöchiger Aufbewahrung im Brutschrank optimal. Der Rinderstamm R₃ hatte schon nach 9 Tagen an Wachstumsintensität eingebüßt. Nach 30 Tagen ließ er sich nicht mehr anzüchten. Nach 70 Tagen waren 4 Stämme (R₂, R₃, R₄, L₄) abgestorben. Am längsten überlebten die Stämme H₁, 1138 und 3 Menschenstämme (Fr, A, 3608), mit denen noch nach 100-tägiger Aufbewahrung geringes Wachstum erzielt wurde.

Übersicht 14

Nährmedium: Rosenow-Medium (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 22°J

Tag										
Stamm	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.	110.
R ₁	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	-	-
R ₂	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-	-
R ₃	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-
R ₄	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	+
H ₁	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
H ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
Hd	+++	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-
L ₄	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
Wilk	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-
1138	+++	+++	+++	++	++	++	++	++	+	+
Fr	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
Var	+++	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	+
A	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-	-	-
3608	+++	+++	+++	++	++	++	++	+	-	-

Noch nach 50 Tagen ließen sich alle Stämme anzüchten.
 Alle Stämme überlebten 70 Tage. Nach 110 Tagen konnte
 nur noch bei 5 Stämmen (R₄, H₂, 1138, Fr, Var) ein schwaches
 Wachstum erzielt werden. Nach 120 Tagen waren alle
 Stämme abgestorben.

Übersicht 15

Nährmedium: Rosenow-Medium (15 ml)

Aufbewahrungsbedingungen: aerob, + 4°C

Tag										
Stamm	20.	30.	40.	50.	60.	70.	80.	90.	100.	
R ₁	+++	+++	++	++	+	+	+	+	-	
R ₂	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	-	
R ₃	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	
R ₄	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-	
H ₁	+++	+++	++	++	++	+	+	-	-	
H ₂	+++	+++	+++	+++	++	++	+	+	-	
hd	+++	+++	+++	++	+	+	+	+	-	
L ₄	+++	++	+	+	+	-	-	-	-	
Wilk	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	
1438	+++	+++	+++	++	+	+	-	-	-	
Fr	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	
Var	+++	++	++	+	+	-	-	-	-	
A	+++	++	+	+	+	+	-	-	-	
3608	+++	++	+	+	+	+	+	-	-	

Bei allen Stämmen war das Wachstum nach 20-tägiger Aufbewahrung im Kühlschrank (+ 4°C) noch optimal, und nach weiteren 10 Tagen waren nur bei dem Goldhamsterstamm L₄ und den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) eine geringe Verminderung der Wachstumsintensität festzustellen. 70 Tage wurden nur von dem Goldhamsterstamm L₄ und dem Menschenstamm Var nicht überlebt. Die längste Überlebenszeit von 90 Tagen hatten die beiden Rinderstämmen R₁ und R₄, der Hühnerstamm H₂ und der Hundestamm hd.

Zusammenfassendes Ergebnis:

10 Tier- und 4 Menschenstämme starben nach Anzüchtung auf Traubenzuckerblut-Agar infolge Austrocknung bei Aufbewahrung der Platten bei + 37°C unter aeroben Bedingungen in 3 Tagen ab. Eine Aufbewahrung bei +22°C und + 4°C sowie eine Vermehrung der Eingußmenge des Agars verlängerte die Überlebenszeit. Bei + 22°C ließen sich noch nach 5 Tagen alle Stämme anzüchten, nach 9 Tagen waren 2 Tierstämme (H₂, Wilk) abgestorben. Nach 30-tägiger Aufbewahrung bei + 4°C lebten noch alle Stämme.

Die Überlebenszeit verlängerte sich in flüssigen Nährmedien erheblich. Die längste Überlebenszeit wurde in Rosenow-Medium ermittelt. Alle Stämme ließen sich bei Aufbewahrung bei + 22°C noch mit Erfolg überimpfen:

1. in Thioglykolat-Medium nach 30 Tagen
2. in Leberbouillon nach 14 Tagen
3. in Rosenow-Medium nach 70 Tagen

Eine Aufbewahrung der Kulturen bei + 37°C verkürzte die Überlebenszeit erheblich, jedoch in Rosenow-Medium am geringsten.

In Thioglykolat war die Überlebenszeit bei einer Aufbewahrung von + 4°C gegenüber der Aufbewahrung bei + 22°C etwas verlängert.

Bei den Leberbouillon-Kulturen unterschieden sich die Überlebenszeiten bei Aufbewahrung bei + 37°C und + 22°C nicht wesentlich. Hingegen betrug die Überlebenszeit im Rosenow-Medium bei Aufbewahrung bei + 22°C 70 Tage gegenüber 60 Tagen bei Aufbewahrung bei + 4°C.

Beurteilt man die Ergebnisse nach den Stammarten, so läßt sich feststellen, daß sich alle acetooides thetajotaomicron-Stämme bei der Aufbewahrung unter verschiedenen Bedingungen als weniger resistent erwiesen als die humanen Sphaerophorus varius-Stämme. Der einzige Tierstamm, der es in seiner Überlebenszeit mit den Menschenstämmen aufnehmen konnte, war der von Werner als Sphaerophorus varius differenzierte Kaninchenstamm (1136). Besonders deutlich zeigte sich diese stärkere Überlebenstendenz bei der Leberbouillon bei allen drei Aufbewahrungstemperaturen und bei Thioglykolat bei den Aufbewahrungstemperaturen von + 22°C und + 4°C.

Besprechung

Nachdem es durch die Arbeiten von Werner möglich geworden ist, *Bacteroides thetaiotamicron* von *Sphaerophorus varius* zu unterscheiden, stellte sich für mich die Frage, ob zwischen beiden Keimarten morphologische Unterschiede bestehen.

Zu meinen Versuchen benutzte ich 4 menschliche Stämme der Spezies *Sphaerophorus varius*, 1 tierischen Stamm der gleichen Art und 9 tierische Stämme von *Bacteroides thetaiotamicron*. Morphologisch konnten sie nicht sicher unterschieden werden, jedoch fanden sich bei den humanen Stämmen mehr kokkoide Elemente. Fäden und Stäbchen, die bei den Tierstämmen vorkommen, waren seltener und verkürzten sich in älteren Traubenzuckerblut- und Thioglykolat-Kulturen. Sie nahmen dann ebenfalls kokkoide Formen an. Nach Werner und Müller (1971) bildet *Sphaerophorus varius* schlanke Kurzstäbchen. In flüssigen Medien lassen sich kokkoide bis elliptische Zellen beobachten.

Bestätigen kann ich die Ergebnisse der Autoren, die eine Verkürzung der Elemente in älteren Kulturen sahen. Jansen, Flint Griner (1954) fanden in jungen Leberabszessen längere Fäden, in alten dagegen kurze Stäbchen. Lahelle (1947) isolierte im Zentrum von Nekroseprozessen kokkoide Formen; an der Peripherie, wo die Nekrosen noch jünger sind, wies er Filamente nach.

Auffallend war die bei allen Stämmen zu beobachtende Pleomorphie, die von den meisten Autoren ebenfalls beschrieben wurde. Leichte Auftreibungen und Anschwellungen an den Stäbchenenden konnten regelmäßig beobachtet werden. Ob es sich bei den Y-Formen der fusiformen Elemente um echte Verzweigungen handelte, wie sie Franke (1899) und Prévot (1966) sahen und die Dack, Dragstedt und Heinz (1936) bestritten, konnte nicht sicher festgestellt werden.

Bei allen Tier- und Menschenstämmen kamen unregelmäßig häufig teilweise freie Sphäroblasten vor. Durch Verlängerung der Bebrütungsdauer oder durch die Wahl eines anderen Nährmediums konnte die Häufigkeit ihrer Bildung nicht beeinflusst werden. Auch P r é v o t (1966), der bei allen Sphaerophorus-Arten feststehende Sphäroblasten an den Elementen feststellte, konnte die Einflüsse, die für ihre Bildung notwendig sind, nicht herausfinden.

Schon L o e f f l e r (1884) fiel das merkwürdig gefleckte Aussehen der Keime auf. Nach H a u p t (1964) ist das Bacterium necrophorum nicht gramfest. Mit Löfflers Methylenblau oder Karbolfuchsin erreicht man eine unterbrochene Färbung ("ähnlich Eisenbahnschienen mit Schwellen"). Eine leiterähnliche Anfärbung sah E r n s t (1902) nach Anfärbung der Keime mit Gentianaviolett, Fuchsin und Thionin. S h a w (1955), L a h e l l e (1947), I p p e n und S t o l l (1960) und H a l l m a n n (1961) hielten die Gramfärbung nicht für sehr gut, weil sie den Eindruck einer Sporenbildung hervorrief. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Stämmen wurden Karbolthionin und Löfflers Methylenblau mit gutem Erfolg angewendet. Eisenbahnschienenähnliche Bilder wurden durch dunklere Granula und Farbaufhellungen hervorgerufen. Dunkel gefärbte Pole konnten den Eindruck einer Sporenbildung entstehen lassen.

Gasbildung wurde von allen Autoren je nach verwendetem Stamm und Nährmedium in unterschiedlicher Intensität beobachtet. Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden. Alle Sphaerophorus varius-Stämme vom Menschen bildeten in Thioglykolat in großer Menge H_2S . Im Gegensatz zu ihnen konnten die tierischen Dacteroide thetajotaomicron-Stämme und der vom Kaninchen stammende Sphaerophorus varius-Stamm (1158) mit Bleiacetat getränktes Fließpapier wegen ihrer geringen Gasbildung nur schwach grau färben.

Auf Traubenzuckerblut-Agar war nur eine schwache und oft auch kaum sichtbare Hämolyse festzustellen. Sie ließ sich oft erst nach mehrstündiger Aufbewahrung der Kulturen im Kühlschrank beurteilen. C r o u t t (1930), B e v e r i d g e (1934), H a u p t (1964), K o l l e (1966), H a r t w i g k und T z i m a s (1966) und W e r n e r (1969 a) waren zu ähnlichen Ergebnissen gekommen. Die Beobachtung von L a h e l l e (1947), daß Schäferythrozyten nicht hämolysiert werden, kann nicht bestätigt werden. Auch olivgrüne Höfe um die Kolonien, wie sie von H a l l m a n n (1961) beschrieben wurden, kamen bei den hier verwendeten Stämmen nicht vor.

L e r n e r (1950, 1951 b, 1970), - und R i n t e l e n (1968) und - und M ü l l e r (1971) untersuchten gramnegative anaerobe sporenlose Stäbchen auf die Bildung extrazellulärer Desoxyribonuklease. Bei allen Bacteroides-Arten konnten sie extrazelluläre DNase nachweisen. Bei den Sphaerophorus-Arten war nur Sphaerophorus necrophorus, wo kräftige DNase-Aktivität zu beobachten war, nicht aber Sphaerophorus varius in der Lage, das Enzym zu bilden. Dagegen wurde von mir das Enzym bei allen in dieser Arbeit verwendeten Tier- und Menschenstämmen gefunden. Bei den Menschenstämmen (Fr, Var, A, 3608) und dem Kaninchenstamm (1138), also bei Sphaerophorus varius, war die DNase-Aktivität sogar größer als bei den übrigen Tier- (=Bacteroides thetaiotaomicron-) Stämmen. Dies steht im Widerspruch zu den von W e r n e r und M ü l l e r (1971) erzielten Ergebnissen.

Auf 13 verschiedenen Nährbodenarten und in 3 flüssigen Nährmedien wurde die Wachstumsintensität der verwendeten Keimarten festgestellt. Von den festen Nährböden bewährte sich am besten der Traubenzuckerblut-Agar (nach Zeissler). Er kann als Optimalnährboden bezeichnet werden. Schon das Fehlen von Traubenzucker ließ nur ein geringeres Wachstum zu. Dieses Ergebnis stimmt mit dem von L a h e l l e (1947) überein, der durch Hinzufügen von 0,75 - 2,0 % Glukose zum Nährmedium das Wachstum der Keime stimulierte. Auch C é s a r i und A l l e a u x (1912),

Splauding und Rettger (1937) sowie Klein und Hickel (1965) empfahlen den Zusatz von 0,2 - 1,0 % Traubenzucker, um gutes Wachstum zu erzielen.

Pferdeserum-, Kochblut- und Hefeextrakt-Zystein-Blut-Agar waren ebenso günstig wie Blut-Agar (ohne Glukose). Ungünstig erschien gewöhnlicher Agar, Proteose-Agar Nr. 3 Difco und Zystein-Laktose-Leber-Agar. Auf Gelatine-, Ammonphosphat-, Conradi-Brigalski- und Colamin-Agar konnte keinerlei Wachstum beobachtet werden. Während Zystein, das von Fabelle (1947), Leeren (1947, 1950), Jacob, Bragstedt und Heinz (1936) und Splauding und Rettger (1937) empfohlen wurde, keinen Einfluß auf die Keime zu haben schien, bewirkte der Hefeextrakt eine Wachstumsförderung.

Von den flüssigen Nährmedien bewährte sich am besten das Thio-glykolat-Medium (Oxoid). Gut geeignet waren auch Leberbouillon, Rosenow-Medium, Serum- und Traubenzuckerbouillon. Gewöhnliche Nährbouillon und Leber-Leber-Bouillon konnten erst nach Zugabe von 1 % Pferdeserum befriedigen.

Die Keime erwiesen sich also als hämo- und serophil. Die Angaben der genannten Autoren konnten insofern bestätigt werden.

Auch auf Nährböden, die weder den X- noch den V-Faktor enthielten, konnte ein Wachstum beobachtet werden. Diese Faktoren waren also für die Keime nicht essentiell. Mit diesen Faktoren imprägnierte Plättchen, die auf den Nährboden aufgelegt wurden, stimulierten das Wachstum nicht. Somit waren die positiven Ergebnisse, die Schwabacher, Lukas und Rimington (1947) bei *Bacteroides melaninogenicus* erhielten und die von Hartwigk und Tzimas (1966) bei *Sphaerophorus*-Arten vermutet wurden, nicht zu bestätigen.

10 oder 20 % Gänsegalle konnten das Wachstum der in vorliegenden Arbeit verwendeten Tier- und Menschenstämme nicht fördern. Werner (1969) hatte den Nachweis der Wachstumsförderung

durch Rindergalle für die beim Menschen vorkommenden Eggerthella-Arten größte Bedeutung beigemessen. B e e r e n s (1957, 1962) benutzte einen Rindergalle-Natriumazid-Agar, weil die Ristella-Arten durch Galle stimuliert werden. B e e r e n s, S c h a f f n e r, G u i l l a u m e und C a s t e l (1963) fanden die wachstumsfördernden Substanzen in der neutralen Fraktion des Azeton-Extraktes von Rindergalle.

Mit Fildes-Extrakt (Oxoid), der neben dem technisch reinen X-Faktor (H a u p t, 1964) zahlreiche Wachstumsfaktoren enthält, wurde das Wachstum der Keime nicht verbessert.

Mit je zwei Staph. aureus- und Staph. albus-Stämmen sowie mit drei E. coli- und sechs Ps. aeruginosa-Stämmen konnte unter anaeroben Bedingungen kein Ammenwachstum beobachtet werde. Durch das Hämolyisin der Staphylokokken wurden die Keime entscheidend gehemmt, was mit den Beobachtungen von H a r t w i g k und T z i m a s (1966) übereinstimmt, die im übrigen ein nicht regelmäßig reproduzierbares Ammenwachstum der von ihnen benutzten Keime mit Staphylococcus pyogenes aureus feststellten. Die Symbiose, die auch von anderen Autoren beschrieben wurde (S c h m o r l (1891), B e v e r i d g e (1934), B u h l e r, S e e l y und D i x o n (1942), G i b b o n s und M a c D o n a l d (1960), H a u p t (1964), S i m o n und S t o v e l l (1969) und L a h e l l e (1947) beruht möglicherweise mehr auf einer Sauerstoffzehrung der fakultativen Anaerobier als auf einer Wirkung von Wachstumsfaktoren, die die Keime absondern.

Bei der Prüfung von Bakterienstämmen auf ihre Überlebenszeit nach Aufbewahrung der Stammkulturen hat sich die Keimzählung bewährt, weil sie ermöglicht, die Reduktion der Keimzahlen in den einzelnen Aufbewahrungszeiten weitgehend genau festzustellen. Ich bemühte mich, direkte und indirekte Zählungen

der Keime nach Ab- oder Aufschwemmung in zubereiteten Verdünnungen durchzuführen, mußte aber dieses Vorgehen aufgeben, weil die Ergebnisse der Zählungen nicht reproduzierbar waren.

Zu meinen Ergebnissen bei der Untersuchung auf überlebende Keime ist kritisch zu bemerken, daß sie möglicherweise nicht in jedem Fall überlebende Keime erfaßten; denn es unterlag einem gewissen Zufall, ob ich bei der Inokulumentnahme von der Traubenzuckerblut-Agar-Platte mit der Platinöse und bei den flüssigen Nährmedien mit der Pipette lebende oder abgestorbene Keime erfaßte. In Hinsicht auf die Parallelität der Ergebnisse bei den verschiedenen Versuchsreihen mit gleichem Nährmedium und verschiedenen Aufbewahrungszeiten sowie in Hinsicht auf das Absterben gleicher Stammarten bei gleich langer Aufbewahrungszeit glaube ich aber doch, daß meine Untersuchungsergebnisse zutreffend sind. Sie lassen Rückschlüsse auf die Überlebensfähigkeit der verschiedenen Stämme bei Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen zu.

Zur Aufbewahrung kann Traubenzuckerblut-Agar nur bei genügender Schichtdicke des Agars empfohlen werden. Die Kulturen müssen außerdem bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt werden. Unter diesen Bedingungen überlebten alle in vorliegender Arbeit verwendeten Stämme wenigstens 7 Wochen. War die Eingabemenge des Nährmediums geringer, so verminderte sich die Überlebenszeit. Höhere Temperaturen ließen die Kulturen rasch eintrocknen.

Von den drei flüssigen Nährmedien bot das Rosenow-Medium die beste Möglichkeit, die geprüften 14 Stämme lebend zu erhalten. Die längste Überlebenszeit war bei $+ 22^{\circ}\text{C}$ mit 70 Tagen zu erzielen. Bei $+ 37^{\circ}\text{C}$ waren die Kulturen nicht länger als 20 Tage lebend zu erhalten. Bei $+ 4^{\circ}\text{C}$ überlebten alle Stämme wenigstens 60 Tage. Die längere Überlebenszeit bei $+ 22^{\circ}\text{C}$ gegenüber $+ 4^{\circ}\text{C}$ dürfte sich dadurch erklären, daß die Keime sich bei dieser Temperatur noch verzögert vermehren konnten und daher bei Abimpfung nach längerer Aufbewahrung noch in lebendem Zustand gefunden wurden.

Zusammenfassung

Untersuchungen an 4 humanen *Sphaerophorus varius*-Stämmen, 1 Tierstamm der gleichen Art und an 9 tierischen *Bacteroides thetajoamicron*-Stämmen führten zu folgenden Ergebnissen:

1. Morphologisch ließen sich beide Stammarten nicht sicher unterscheiden, jedoch kamen bei den humanen Stämmen vorwiegend kokkoide Formen, bei den tierischen Stämmen hauptsächlich Fäden und Stäbchen vor, die sich in älteren Kulturen verkürzten. Alle Stämme bildeten H_2S , jedoch war die H_2S -Bildung bei den Menschenstämmen besonders stark. Auf Traubenzuckerblut-Agar wirkten alle 14 Stämme schwach hämolytisch, wobei die Art der Hämolyse nicht festzustellen war.
2. Alle 14 Stämme bildeten extrazelluläre Desoxyribonuklease. Bei den *Sphaerophorus varius*-Stämmen war die DNase-Aktivität stärker als bei *Bacteroides thetajoamicron*.
3. Für die Weiterzüchtung der Kulturen bewährte sich der Traubenzuckerblut-Agar (nach Zeissler) und flüssiges Thioglykolat-Medium (Oxoid) am besten. Hefeextrakt, 1 % Pferdeserum und 1 % Glukose stimulierten das Wachstum der Keime deutlich.
4. Wachstumsförderung erfolgte durch Zusätze von Zystein, 1 - 3 % Fildes-Extrakt, 10 und 20 % Rindergalle sowie durch den X- und V-Faktor (Plättchentest) zum Nährmedium nicht.
5. Durch Benutzung von je 2 *Staph. aureus*- und *Staph. albus*-Stämmen sowie 3 *E. coli*- und 6 *Ps. aeruginosa*-Stämmen als Ammen konnte unter anaeroben Bedingungen keine Verbesserung des Wachstums von *Sphaerophorus varius* und *Bacteroides thetajoamicron* erzielt werden.
6. Bei Aufbewahrung bei $+4^{\circ}C$ unter aeroben Bedingungen ließen sich Traubenzuckerblut-Agar-Kulturen von *Sphaerophorus varius* und *Bacteroides thetajoamicron* 7 Wochen lebend erhalten. Als optimal zur Aufbewahrung der Kulturen erwies sich das Rosenow-Medium. In diesem Medium blieben die Kulturen bei $+22^{\circ}C$ 10 Wochen lebend.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- Aalbaek, B. Sphaerophorus necrophorus. A study
of 23 strains
Acta vet. Scand. 12, 344 (1971)
- Bang, B. Om Aasargen til lokal nekrose
(Über die Ursachen der lokalen Nekrosen)
Mskr. Dyrlaeg. 2, 235 (1891/92)
- Beerens, H. Les bactéries anaérobies.
in: Manuel de techniques bactériologiques.
Ed. R. Buttiaux u.a.
Flammarion, Paris 1962
- Beerens, H. Milieux sélectifs pour l'isolement
de quelques espèces de bactéries
anaérobies à Gram négatif
Ann. Inst. Pasteur Lille. 9, 86 (1957)
- Beerens, H. u.
M.M. Castel Action de la bile sur la croissance
de certaines bactéries anaérobies à
gram-négatif
Ann. Inst. Pasteur Paris. 99, 454 (1960)
- Beerens, H.,
M.M. Castel u. Classification des Bacteroidaceae
in: Abstracts VIIIth International
Congress for Microbiology
Montreal 1962, S. 120
- Beerens, H.,
Y. Schaffner,
J. Guillaume u.
M.M. Castel Les bacilles anaérobies non sporolés
à Gram négatif favorisés par la bile.
Leur appartenance au genre Eggerthella
(nov. gen.)
Ann. Inst. Pasteur Lille. 14, 5 (1963)
- Behrens, H. Lehrbuch der Schafkrankheiten
Parey, Berlin u. Hamburg 1962
- Behrens, H.,(Hrsg.) Lehrbuch der Schafzucht
H. Doehner,
R. Scheelje u.
R. Wassermuth Parey, Berlin u. Hamburg 1969

- Beveridge, W.J.B. A study of twelve strains of *Bacillus necrophora* with observations on the oxygen tolerance of the organism
J. Path. Bact. 38, 467 (1934)
- Breed, R.S., (Hrsg.) Bergey's manual of determinative
E.G.D. Murray u. bacteriology. 7. ed.
H.R. Smith Williams and Wilkins, Baltimore 1957
- Buhler, V.B., Bacterium *necrophorus* septicemia
C.W. Seely u. in man
D.D. Dixon Amer. J. Clin. Path. 12, 380 (1942)
- Césari, E. u. Études sur le bacille de Schmorl.
V. Alleaux Premier Mémoire: Rôle pathogène,
morphologie, cultures, biologie,
isolement
Ann. Inst. Pasteur Paris. 26, 625 (1912)
- Christ, F. Über Erkrankungen durch anaerobe,
nicht sporenbildende Bakterien
Dtsch. Arch. klin. Med. 203, 186 (1956)
- Dack, G.M., Bacterium *necrophorum* in chronic
L.R. Dragstedt u. ulcerative colitis
L.E. Heinz J. Amer. Med. Ass. 106, 7 (1936)
- Dack, G.M., Comparison of *Bacterium necrophorum*
L.R. Dragstedt, from ulcerative colitis in man with
R. Johnson u. strains isolated from animals
J. Infect. Dis. 62, 169 (1938)
- McCullough
Dietrich, H., Über Auftreten und Resistenzbestimmung
W. Klein u. anaerober sporenloser Infektionserreger
H. Nickel Zbl. Bakt. I. Orig. 197, 515 (1965)
- Doehner, H. Handbuch der Schafzucht und Schaf-
haltung. 3. Band
Parey, Berlin 1944
- Ernst, W. Ueber Nekrosen und den Nekrose-
bacillus (*Streptothrix necrophora*)
Mhefte prakt. Tierh. 14. (193 (1902)

- Feldmann, W.H.,
H.R. Hester u.
F.P. Wherry
The occurrence of *Bacillus necrophorus*
agglutinins in different species of
animals
J. Infect. Dis. 59, 159 (1936)
- Floyd, T.M. u.
G.M. Dack
The isolation of *Bacterium necrophorum*
in the presence of *Proteus*
J. Infect. Dis. 64, 269 (1939)
- Forget, A. u.
Sodium azide selective medium for the
primary isolation of anaerobic bacteria
J. Bact. 83, 1217 (1962)
- Francke, -
Der Necrose-Bacillus als Krankheits-
erreger bei unseren Haustieren
Berl. tierärztl. Wschr. S. 299 (1899)
- Gibbons, R.J. u.
J.B. MacDonald
Hemin and vitamin K compounds as
required factors for the cultivation
of certain strains of *Bacteroides*
melaninogenicus
J. Bact. 80, 164 (1960)
- Grumbach, A. u.
W. Kikuth (Hrsg.)
Die Infektionskrankheiten des
Menschen und ihre Erreger.
Band 2. S. 1073
Thieme, Stuttgart 1958
- Hallmann, L.
Bakteriologie und Serologie. 3.Aufl.
Thieme, Stuttgart 1961
- Harders, H. u.
H. Hornbostel
Infektion mit *Bact. necroseos*
beim Menschen
Zbl. Bakt. I. Orig. 156, 582 (1950/51)
- Hartwigk, H. u.
P. Tzimas
Resistenzbestimmungen an "*Necrobacterium*
necrophorum Thjötta 1945" (*Sphaerophorus*
necrophorus)
Zbl. Bakt. I. Orig. 208, 430 (1968)
- Hartwigk, H. u.
P. Tzimas
Über das Vorkommen von *Necrobact.*
Necrophorum Thjötta 1945 in tierischem
Untersuchungsmaterial
Zbl. Vet. Med. B. 13, 601 (1966)

- Haupt, H. Medizinisch-bakteriologische Diagnostik
für Ärzte und Tierärzte
Enke, Stuttgart 1964
- Hiepe, Th. Schafkrankheiten
VEB Fischer, Jena 1970
- Hine, M.K. u. G.P. Berry Morphological and culturel studies
of the genus *Fusiformis*
J. Bact. 34, 517 (1937)
- Ippen, R. u. L. Stoll Enzootischer Nekrobazilloseverlauf
bei Saiga-Antilopen
Arch. exper. Vet. med. 14, 1220 (1960)
- Jensen, A., J.C. Flint u. L.A. Griner Experimental hepatic necrobacillosis
in beef cattle
Amer. J. Vet. Res. 15, 5 (1954)
- Kolle, W. u. H. Hetsch Experimentelle Bakteriologie und
Infektionskrankheiten. 11. Aufl.
Urban u. Schwarzenberg, München-Berlin 1952
- Lahelle, O. *Necrobacterium*, a study of its bacteriology,
serology and pathogenicity and its relation
to *Fusobacterium*
Acta path. microbiol. Scand. Suppl. 68 (1947)
- Loeffler, F. Untersuchungen über die Bedeutung
von Mikroorganismen
Mitt. Kaiserl. Gesundheitsamt. 2, 421 u. 489
(1884)
- Mitsuoka, T., T. Segi u. S. Yamamoto Ein neuer Selektivnährboden für
Bacteroides
Zbl. Bakt. I. Orig. 195, 69 (1965)
- Oppermann, Th. Lehrbuch der Krankheiten des Schafes.
4. Aufl.
Schaper, Hannover (1946)

- Orcutt, M.L. A study of *Bac. necrophorus*
obtained from cows
J. Bact. 20, 343 (1930)
- Prévot, A.R. Techniques pour le diagnostic
des bactéries anaérobies
Ed. de la Tourelle, St-Mandé (Seine) 1966
- Reinhold, L. Serologische Untersuchungen an
Stämmen von *Bacteroides thetaiotaomicron*
und *Bacteroides fragilis* im Agargel-
präzipitationstest
Zbl. Bakt. I. Orig. 216, 219 (1971)
- Rewo, M.W. u.
M.D. Shukowa Veterinärmedizinische Mikrobiologie
Fischer, Jena 1963
- Rolle, M. u. Mikrobiologie und allgemeine
Seuchenlehre. 3. Aufl.
Enke, Stuttgart 1958
- Rosen, M.N. Necrobacillosis
Davies, J.W. (Hrsg.) in: Infectious diseases of
L.H. Karstad u. wild mammals
D.O. Trainer The Iowa State Univ. Ames, Iowa, USA 1970
- Rothberg, N.W. u. Extracellular desoxyribonucleases in
M.N. Swartz members of the family Enterobacteriaceae
J. Bact. 90, 294 (1965)
- Schmorl, G. Über ein pathogenes Fadenbakterium,
Streptothrix cuniculi
Dtsch. Zschr. Tiermed. 17, 375 (1891)
- Schoop, G. Züchtung von Nekrosebakterien
Dtsch. tierärztl. Wschr. 47, 433 (1939)
- Schwabacher, H., *Bacterium melaninogenicum* -
D. Lukas u. a misnomer
C. Rimington *J. Gen. Microbiol.* 1, 109 (1947)
- Scrivner, L.H. u. The morphology, culture isolation
A.M. Lee and immunity studies of *Actinomyces*
necrophorus in calf diphtheria
J. Amer. Vet. Med. Ass. 85, 360 (1934)

- Shaw, F.W. Human necrobacillosis
Zbl. Bakt. I. Orig. 129, 132 (1933)
- Simon, P.C. u.
P.L. Stovell Diseases of animals associated with
Sphaerophorus necrophorus: characteristics
of the organism
Vet. Bull. 39, 311 (1969)
- Soltys, M.A. Bacteria and fungi pathogenic
to man and animals
Bailliére, Tindall & Cox, London 1963
- Spaulding, E.H. u.
L.F. Rettger The Fusobacterium genus.
1. Biochemical and serological
classification.
2. Some observations on growth
requirements and variations
J. Bact. 34, 535 u. 549 (1937)
- Stummelcliff, L.A. A study of Actinomyces necrophorus
in soil cultures
J. Infect. Dis. 62, 58 (1938)
- Werner, H.
a. Sphaerophorus intermedius Bergan
and Movig 1968 ein späteres und
illigitimes Homonym von Bacteroides
fragilis (Veillon und Zuber 1898)
Castellani und Chalmers (1919)
b. Bacteroides convexus Eggerth und
Gagnon 1933 identisch mit Bacteroides
fragilis (Veillon und Zuber 1898)
Castellani und Chalmers (1919)
Zbl. Bakt. I. Orig. 211, 107 u. 344 (1969)
- Werner, H. Das kulturell-biochemische Verhalten
und die Antibiotikaempfindlichkeit des
Bacteroides putredinus (Weinberg et al.
1937) Kelly 1957
Zbl. Bakt. I. Orig. 215, 327 (1970)
- Werner, H. Die gramnegativen anaeroben sporenlosen
Stäbchen des Menschen
VEB Fischer, Jena 1968
(Infektionskrankheiten und ihre Erreger.
Bd. 9)

- Werner, H. Otogener Hirnabszeß und Meningitis
durch *Eggerthella convexa*
Zbl. Bakt. I. Orig. 194, 203 (1964)
- Werner, H. Zum gegenwärtigen Stand der Diagnostik
der gramnegativen anaeroben sporenlosen
Stäbchen (Übersichtsreferat)
Zbl. Bakt. Ref. 197, 137 (1965)
- Werner, H. u.
G. Boll Die Antibiotikaempfindlichkeit von
Bacteroides (*Eggerthella*)-Stämmen
Zbl. Bakt. I. Orig. 208, 437 (1968)
- Werner, H. u.
H.E. Müller Immunelektrophoretische Untersuchungen
über die Einwirkung von *Bacteroides*-,
Fusobacterium-, *Leptotrichia*- und
Sphaerophorus-Arten auf menschliche
Plasmaproteine
Zbl. Bakt. I. Orig. 216, 96 (1971)
- Werner, H.,
F. Neuhaus u.
C. Reicherts Otogener Hirnabszeß durch die darmbe-
wohnende *Bacteroides*-Art *B. fragilis*
Dtsch. med. Wschr. 95, 343 (1970)
- Werner, H. u.
G. Rintelen Untersuchungen über die Konstanz der
der Kohlenhydratspaltung bei intestinalen
Bacteroides (*Eggerthella*)-Arten
Zbl. Bakt. I. Orig. 208, 521 (1968)
- Willis, A.T. Anaerobic bacteriology in clinical
medicine
Butterworth, London 1960

Für die Überlassung des Themas und für die mir jederzeit gewährte großzügige Unterstützung meiner Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr. H. Hartwig herzlich danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts sei für die mir gewährte Hilfe ebenfalls gedankt.

Lebenslauf

Am 17. Oktober 1944 bin ich, Holger Burgard, auf Helgoland als Sohn von Erwin Burgard und seiner Ehefrau Hanna Burgard, geb. Denker, geboren. Meine Staatsangehörigkeit ist deutsch.

Ostern 1951 bin ich in die Volksschule Hesemannstraße in Hannover eingeschult worden. Ostern 1956 wechselte ich auf die Lutherschule. Von Ostern 1959 bis zum Abitur am 16. Februar 1966 besuchte ich die Herschelschule in Hannover.

Zum Sommersemester 1966 immatrikulierte ich mich an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, wo ich nach dem Wintersemester 1967/68 die tierärztliche Vorprüfung bestand. Danach wechselte ich an die Freie Universität Berlin. Hier war ich vom Sommersemester 1968 bis zum Sommersemester 1970 am Fachbereich Veterinärmedizin eingeschrieben. Am 8. April 1971 bestand ich das Staatsexamen in Berlin.

Meine Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 2. Juni 1971. Seit dem 1. April 1971 bin ich in der Veterinärmedizinischen Bibliothek als Teilzeitassistent tätig.

Am 19. Juli 1968 heiratete ich Renate Kober und siedelte nach Berlin (West) um.

